



**LIGA AGRÍCOLA INDUSTRIAL DE LA CAÑA DE AZÚCAR -LAICA-
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN
DE LA CAÑA DE AZÚCAR -DIECA-**

**INFORME ANUAL 2020
BIOLOGÍA MOLECULAR**



**San José, Costa Rica
Diciembre 2020**

Índice de Contenido

Presentación	3
Proyectos ejecutados	4
Comparación de técnicas para la detección del Virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar (ScYL) en caña de azúcar (<i>Saccharum</i> spp.) y cuantificación de la carga viral.....	4
➤ Introducción.....	4
➤ Metodología	5
➤ Resultados y discusión	6
➤ Conclusiones	11
Identificación molecular de microorganismos contaminantes de medios de cultivo y de interés agronómico.....	11
➤ Introducción.....	11
➤ Metodología	12
➤ Resultados y discusión	13
➤ Conclusiones	16
Identificación molecular de especies del barrenador de la caña de azúcar (<i>Diatraea</i> spp.) en Costa Rica.....	17
➤ Introducción.....	17
➤ Metodología	17
➤ Resultados y discusión	18
➤ Conclusiones	20
Evaluación de marcadores moleculares tipo microsatélites (SSR) para la diferenciación de dos variedades de caña de azúcar (<i>Saccharum</i> spp.).....	21
➤ Introducción.....	21
➤ Metodología	22
➤ Resultados y discusión	24
➤ Conclusiones	30
Diagnóstico molecular de la infección por Nosemosis en el proceso de producción del controlador biológico <i>Cotesia flavipes</i>	30
➤ Introducción.....	30
➤ Metodología	31
➤ Resultados y discusión	32
➤ Conclusiones	36
Referencias bibliográficas	37

Presentación

La agrobiotecnología, es una ciencia derivada de la biotecnología especializada en el desarrollo de investigaciones enfocadas al mejoramiento de la agricultura, técnicas agropecuarias, genómica ambiental, fitosanidad y productos biotecnológicos dirigidos al incremento de la productividad. Dentro de las técnicas utilizadas en esta área, se encuentra el cultivo *in vitro* de células y tejidos, la fermentación y el control biológico de plagas.

Con el advenimiento de los avances en biología molecular, ésta se ha convertido en una herramienta fundamental de la agrobiotecnología. Esta rama se basa fundamentalmente en el estudio de las moléculas que rigen las funciones vitales de las células, y por ende, de los seres vivos, como el ADN, ARN y proteínas, así como sus interacciones.

El potencial de la biología molecular radica en el conocimiento de la estructura y propiedades de estas moléculas, con el fin de diseñar técnicas novedosas que permitan conocer la genética de las poblaciones; identificar genes que son de interés agronómico; realizar un diagnóstico, seguimiento y control eficiente de enfermedades; identificación de especies de interés; desarrollo de programas de fitomejoramiento; e infinidad de aplicaciones.

Mediante el Programa de Biología Molecular se pretende contribuir al desarrollo de la investigación en el sector azucarero costarricense, mediante la validación de protocolos, el desarrollo y ejecución de proyectos basados en técnicas altamente específicas y novedosas de la biología molecular, tales como marcadores genéticos, expresión génica, amplificación y secuenciación de fragmentos del ADN. Con el propósito de generar información valiosa para el mejoramiento de variedades, de productos agrobiotecnológicos, el saneamiento de fitopatógenos y el potencial productivo de la agroindustria azucarera.

Ing. Agr. Marco A. Chaves Solera
Gerente DIECA

Proyectos ejecutados

A continuación se exponen los proyectos ejecutados en el periodo 2019-2020, mediante los cuales se brindó aporte a las distintas líneas operativas de DIECA: fitosanidad, cultivo *in vitro*, control integrado de plagas, producción de controladores biológicos y variedades de caña de azúcar. Los mismos se caracterizaron por generar un impacto a nivel de todas las regiones del país.

Se explica de forma breve la descripción e importancia de cada uno, a modo de introducción; así como la metodología utilizada, los resultados obtenidos y discusión de los mismos y las conclusiones.

Comparación de técnicas para la detección del Virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar (ScYL) en caña de azúcar (*Saccharum* spp.) y cuantificación de la carga viral

Introducción

El Síndrome de la Hoja Amarilla (YLS) de la caña de azúcar afecta la productividad de la caña de azúcar provocando severas pérdidas económicas. El principal agente causal de esta enfermedad es el *Virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar* (ScYL), del género *Poleovirus* (Familia *Luteoviridae*), cuyo genoma consiste en una hebra simple de ARN en sentido positivo ((+)ssRNA). Este virus se ha reportado como un importante fitopatógeno alrededor del mundo (Zhu et al., 2010); provocando significativas pérdidas económicas, en el caso de Brasil, país que lidera la producción de azúcar a nivel global, presentó pérdidas en sus cosechas del 25% en los 1990s (Boukari et al., 2019).

En Costa Rica, este virus se encuentra ampliamente distribuido en plantaciones de todas las regiones, con una mayor incidencia en el Valle Central, según resultados del 2006. Se han informado pérdidas aproximadas del 50% del tonelaje entre 1995-2000, en algunas plantaciones de la provincia de Cartago (Chavarría et al., 2006).

Los síntomas típicos visibles asociados a este virus incluyen la clorosis (amarillamiento intenso) de la nervadura central en la superficie de las hojas maduras, y en etapas avanzadas se puede observar necrosis foliar que avanza desde el extremo de la hoja hacia la base, a lo largo de la nervadura central, mientras que la lámina se mantiene verde (Viswanathan et al., 2009).

Muchas de las variedades infectadas no exhiben síntomas, esto se atribuye a múltiples factores, tales como las variaciones genéticas tanto del virus como de la planta, a las condiciones ambientales; y por supuesto, a la carga viral (Chinnaraja et al., 2014).

Asimismo depende de la fase de crecimiento de la planta, usualmente, los síntomas aparecen en la etapa de madurez. También se ha observado que el estado asintomático es el más común de este fitopatógeno (Madugula & Gali, 2017).

Actualmente, en el Departamento de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar (DIECA-LAICA), se lleva a cabo la detección del ScYLV, mediante la prueba serológica DAS-ELISA, la cual se basa en el uso de anticuerpos para detectar partículas virales. Se ha demostrado que la detección por métodos moleculares como la amplificación por transcripción reversa convencional (RT-qPCR) y en tiempo real (RT-qPCR) son 10^2 - 10^5 veces más sensible en comparación con la técnica DAS-ELISA (Abou-Jawdah et al., 2008; Scagliusi et al., 2008).

Por esta razón, se propone la implementación de un protocolo alternativo más económico, operativamente viable y eficaz de detección, para garantizar la sanidad de las plantas propagadas *in vitro*, que posteriormente serán cultivadas en campo. El método de diagnóstico, debe ser altamente sensible para detectar cargas virales relativamente bajas con el propósito de evitar los falsos negativos y contribuir a la propagación y dispersión de estos virus (Xie et al., 2009), como las técnicas moleculares. Por lo tanto el objetivo del presente estudio fue comparar la eficiencia y sensibilidad de tres métodos de detección del ScYLV y estimar la carga viral mediante la técnica RT-qPCR.

Metodología

Se utilizaron 30 hojas de caña de azúcar, correspondiente a plantas colectadas de distintas regiones del país seleccionadas al azar (especificadas en el Cuadro 4). Se seleccionó la hoja +3 para el análisis, debido a que se ha comprobado que es donde se concentra la mayor carga de fitopatógenos. Adicionalmente, se utilizaron dos muestras de lámina de plantas propagadas *in vitro* en el Laboratorio de Cultivo Vegetal en DIECA (códigos C1 y C2).

El material fue almacenado a -80°C para evitar la degradación de material genético, las cuales fueron utilizadas posteriormente para el diagnóstico serológico y molecular. Para llevar a cabo la detección del virus ScYLV, se comparó los resultados de tres técnicas: DAS-ELISA, RT-PCR y RT-qPCR, con el propósito de determinar la técnica más sensible, específica y eficiente.

Los resultados de la prueba DAS-ELISA fueron obtenidos mediante el protocolo descrito por Chavarría et al., 2006. Una vez que fue tomada la cantidad de tejido necesaria para llevar a cabo las pruebas serológicas, las mismas hojas fueron almacenadas dentro de bolsas herméticas a -80°C hasta su uso para los análisis moleculares. Se realizó extracción de ARN a dichas muestras mediante un kit de extracción comercial. La calidad e integridad del material genético fue evaluada por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa.

Para la detección del ScYLV se llevó a cabo la RT-PCR, probando tres cebadores distintos (F201/ R201, F615/R615 y F512/R512). Las reacciones de PCR se prepararon utilizando el kit comercial GoTaq® 1-Step RT qPCR (Promega), el cual permite ejecutar el procedimiento en un sólo paso, es decir, la reacción de transcripción reversa (síntesis de ADN copia a partir del ARN molde) y PCR (síntesis de la doble hebra del ADN copia y amplificación) se llevan a cabo en el mismo tubo de reacción; esto reduce el consumo de tiempo y la posibilidad de contaminación cruzada. Para revelar los resultados de la reacción por RT-PCR se realizó electroforesis en gel de agarosa.

La identidad de algunos amplicones obtenidos por RT-PCR se confirmó mediante secuenciación Sanger por electroforesis capilar (Macrogen, Korea). Las secuencias resultantes fueron editadas y analizadas mediante distintos programas bioinformáticos.

Para la RT-qPCR se seleccionaron los cebadores F201/R201, los cuales amplifican un fragmento de tamaño adecuado para PCR tiempo real (201 pb), ya que la longitud del producto de amplificación debe ser aproximadamente entre 50-200 pb, debido a que amplicones con tamaño considerablemente superior a las 200 pb reducen la eficiencia y especificidad de la reacción de PCR tiempo real. La RT-qPCR se realizó en un solo paso con 1X de Master Mix power Up™ SYBR Green (Applied Biosystems).

Para llevar a cabo la cuantificación de la carga viral se construyeron curvas estándar para estimar la eficiencia de la reacción y la cuantificación del objetivo (target) viral en las muestras desconocidas. Para la preparación de los estándares de ADN copia (ADNc) viral, se utilizó una muestra previamente confirmada por secuenciación. A partir de esta muestra purificada, se prepararon seis diluciones seriadas (diluidas 10 veces) en un rango de 10^5 fg – 1 fg, por reacción. Finalmente, la eficiencia del ensayo en nuestras condiciones experimentales fue determinada en términos de porcentaje mediante la siguiente fórmula: $(10^{(-1/m)} - 1) \times 100\%$.

Resultados y discusión

Se probaron tres pares de cebadores para detectar la presencia del ScYLV en muestras de hojas colectadas en campo, mediante la técnica de RT-PCR. Los mismos demostraron ser eficientes para la detección del virus, ya que se visualizó una banda nítida del tamaño molecular esperado, según cada cebador, así como ausencia de amplificaciones inespecíficas en las muestras positivas. En la Figura 1 se muestran algunos de los productos PCR generados por dos de los cebadores: ScYLV-F201/R201 y ScYLV-F512/R512.

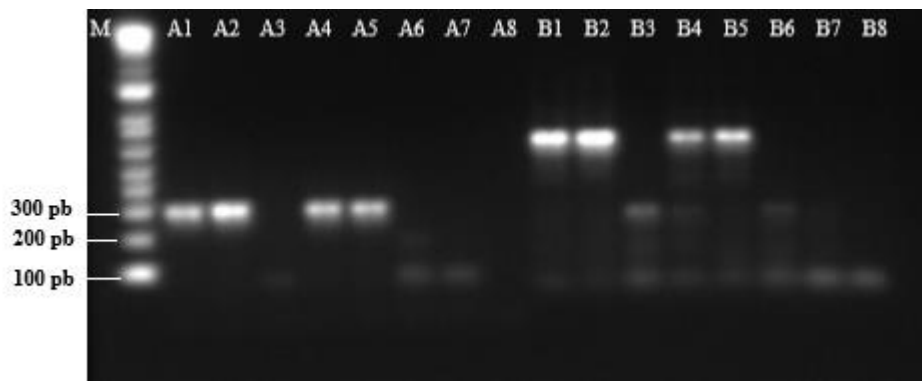


Figura 1. Productos de RT-PCR obtenidos a partir de láminas de caña de azúcar analizadas para determinar la presencia/ausencia del ScYLV, mediante los cebadores ScYLV-F201/R201 (muestras con código A) y ScYLV-F512/R512 (muestras con código B).

Las muestras correspondientes a 34 hojas de caña de azúcar fueron sometidas a diagnóstico del virus ScYLV mediante tres técnicas distintas: DAS-ELISA, RT-PCR y RT-qPCR. Del total de muestras analizadas, se obtuvo un 29,41% (10/34) de hojas seropositivas para la presencia del virus, mientras que la RT-PCR detectó un 73,53% positivas (25/34) y mediante la de RT-qPCR se encontró un 76,47% (26/34) de muestras con presencia del ScYLV (Cuadro 1).

La técnica que detectó la menor cantidad de muestras fue la técnica serológica, seguida por la amplificación RT-PCR y la técnica más sensible fue la RT-qPCR, además mediante esta última se logró realizar una aproximación de la carga viral, expresada en fg, de un fragmento del gen supresor de silenciamiento génico del virus ScYLV.

La técnica RT-qPCR no solo demostró ser la más sensible para la detección del virus, también brindó datos cuantitativos de la carga viral. En contraposición, la técnica de ELISA fue menos específica y sensible, para la obtención de resultados de presencia/ausencia del ScYLV, esto también se evidencia en los resultados positivos de las muestras C1 y C2 (Cuadro 1), correspondientes a plantas propagadas *in vitro*, las cuales deben pasar las pruebas serológicas de comprobación de sanidad de material que proviene de campo antes de iniciar la fase de propagación. Esto significa que, dicho material representa falsos negativos por análisis de DAS-ELISA.

Está ampliamente reportado que las aproximaciones moleculares son más específicas y sensibles en comparación con los inmunoensayos (Aljanabi et al., 2001; Balmaseda et al., 2018; Soltan et al., 2016), por lo tanto, las muestras que resultaron seropositivas y negativas con ambas técnicas moleculares (L1592 y L1536), podría atribuirse a distintos factores, como por ejemplo: a) baja especificidad de la técnica DAS-ELISA, porque detecta la proteína de la cápsula, altamente conservada entre todos los poleovirus (EISayed et al., 2011); b) la distribución desigual del virus en la planta y por consiguiente, en las hojas

(Chatenet et al., 2001); c) ruido de fondo (Background) y otras reacciones inespecíficas causadas por el anticuerpo secundario (Terato et al., 2014).

Cuadro 1. Evaluación de tres técnicas para detectar la presencia del ScYLV en muestras de tejido foliar de caña de azúcar y cuantificación de la carga viral por RT-qPCR.

Información de las muestras			Técnica 1	Técnica 2	Técnica 3 (RT-qPCR)			
Procedencia	Variiedad	Código	DAS-ELISA	RT-PCR	RT-qPCR	Valores de Cq	Valores de temperatura de fusión	Valores de concentración estimados (fg)
Desconocida	LAICA1604	L1436	-	-	-	27,5	76,07	NA
	LAICA10207	L1468	-	+	+	26,82	81,98	9,10
	LAICA12340	L1536	+	-	-	31,04	75,82	NA
	LAICA12340	L1546	+	+	+	25,54	82,14	19,86
	LAICA12340	L1555	+	+	+	24,74	82,21	32,34
	LAICA12340	L1580	-	-	-	31,91	75,94	NA
	LAICA12340	L1584	+	+	+	27,87	82,42	4,80
	LAICA12340	L1592	+	-	-	30,35	76,02	NA
	LAICA12340	L1594	+	+	+	23,61	81,70	64,39
Coope Victoria, Grecia, Alajuela	CT11055	CT1008	-	-	-	26,83	76,28	NA
	CT11055	CT1019	-	+	+	24,26	82,35	43,33
	CT11055	CT1028	-	+	+	21,1	82,26	297,23
	CT11055	CT1033	-	+	+	27,19	82,21	7,27
	CT11055	CT1044	-	-	-	29,36	76,32	NA
	CT11055	CT1048	-	-	-	30,92	76,08	NA
	CT11055	CT1049	-	-	-	30,07	76,21	NA
	CT11055	CT1050	-	+	+	20,18	82,6	520,70
	CT11055	CT1054	-	+	+	25,73	82,09	17,69
	CT11055	CT1063	-	+	+	19,92	82,05	610,10
	CT11055	CT1072	-	+	+	24,33	82,06	41,56
	CT11055	CT1076	-	+	+	23,17	82,00	84,18
	CT11055	CT1084	-	+	+	22,68	82,07	113,48
Taboga, Cañas, Guanacaste	RB867515	RB879	+	+	+	21,73	82,32	202,47
	RB867515	RB880	+	+	+	26,27	82,44	12,73
	RB867515	RB890	-	+	+	24,09	82,45	48,05
	RB867515	RB901	-	+	+	23,08	82,31	88,93
	RB867515	RB913	-	+	+	21,92	83,02	180,33
	RB867515	RB915	-	+	+	21,35	82,69	255,23
	RB867515	RB967	-	+	+	26,58	82,60	10,54
	RB867515	RB976	-	+	+	24,23	82,32	44,12
	RB867515	RB978	+	+	+	28,04	82,36	4,33
RB867515	RB980	+	-	+	30,75	82,65	0,83	
Laboratorio (in vitro)	Desconocida	C1	-	+	+	18,48	82,65	1467,31
	Desconocida	C2	-	+	+	20,88	82,48	339,87
	Agua PCR	C-	-	-	-	30,91	82,32	NA

NA= No aplica, no hay concentración en muestras negativas

Todas las muestras fueron cuantificadas (concentración en fg) y también se calculó la curva de fusión para comprobar la especificidad del ensayo por la RT-qPCR en tiempo real (Cuadro 1). Asimismo, hubo una alta correlación ($R^2=0,9976$) entre el Ct y la concentración de ADNc viral cuantificado (estándares) usando espectrofotometría (Figura 2.B); indicando que el valor de Ct generado es proporcional a la cantidad de ARN presente. Las curvas y Ct de amplificación correspondientes a los estándares se muestran en la Figura 2.A. la amplificación de estándares se confirmó mediante visualización en geles de agarosa (Figura 2.D).

Mediante este ensayo se logró validar la cuantificación de ADNc viral presente en las muestras analizadas por la técnica de RT-qPCR. Esta aproximación posee el potencial para ser aplicada en la estimación de los niveles de resistencia en variedades de caña de azúcar de alto interés comercial y graficar el progreso de la enfermedad a través del tiempo en las distintas variedades en estudio (Cardozo Burgos, 2017). Sin embargo, se han encontrado diferencias en la susceptibilidad en distintas poblaciones de la misma variedad, debido a que pueden acarrearse distintas cepas virulentas y también a la variación somaclonal que es alta en caña de azúcar, estas pequeñas variaciones genéticas pueden suprimir la replicación del virus (Zhu et al., 2010).

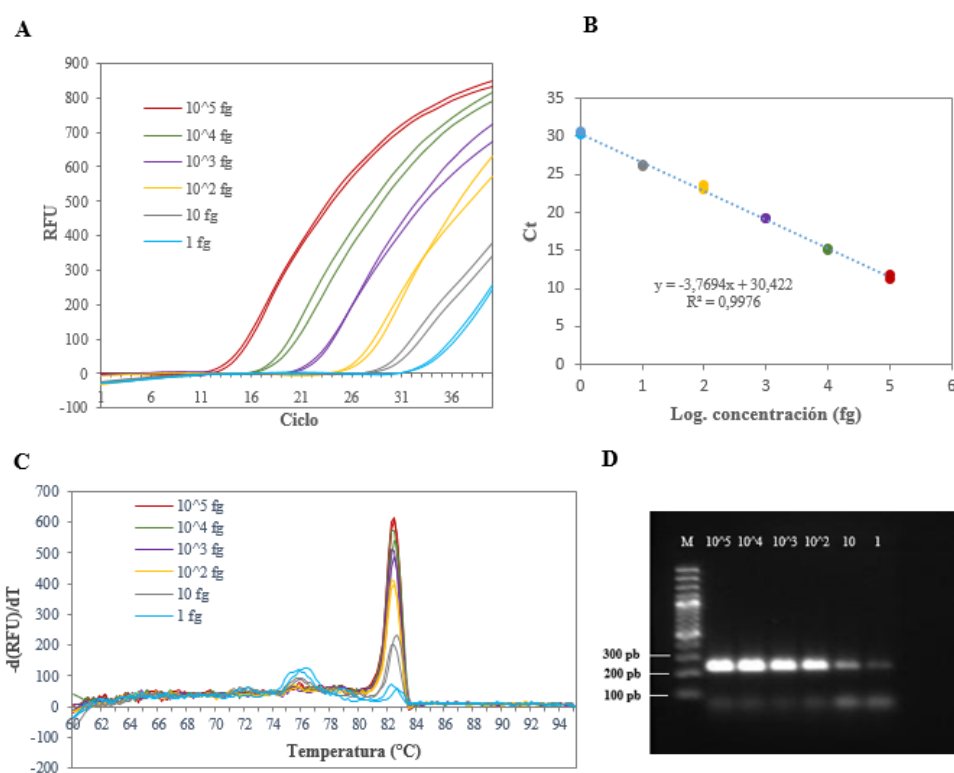


Figura 2. Estándares utilizados en el ensayo de RT-PCR para la cuantificación de la carga viral del ScYLv, en un rango de concentración de 10^5 -1 fg de ADNc viral. A) Curvas de

amplificación, B) Curva de calibración, C) Curvas de fusión, D) Visualización de los amplicones por electroforesis en gel de agarosa 1.5%.

El análisis mediante la herramienta BLASTn reveló que todas las secuencias obtenidas de la amplificación con los cebadores ScYLV-F512/R512 fueron altamente homólogas (superiores al 99%) a secuencias del gen de la proteína de la cubierta del ScYLV accesadas al GenBank.

En cuanto a las secuencias amplificadas con los cebadores ScYLV-F201/R201, las siete muestras analizadas mostraron una similitud superior al 97% frente a secuencias correspondientes al gen supresor de silenciamiento génico, perteneciente al ScYLV almacenadas en el GenBank. Estos análisis de secuencias indican que la banda detectada en las muestras, corresponde, efectivamente, al ScYVL.

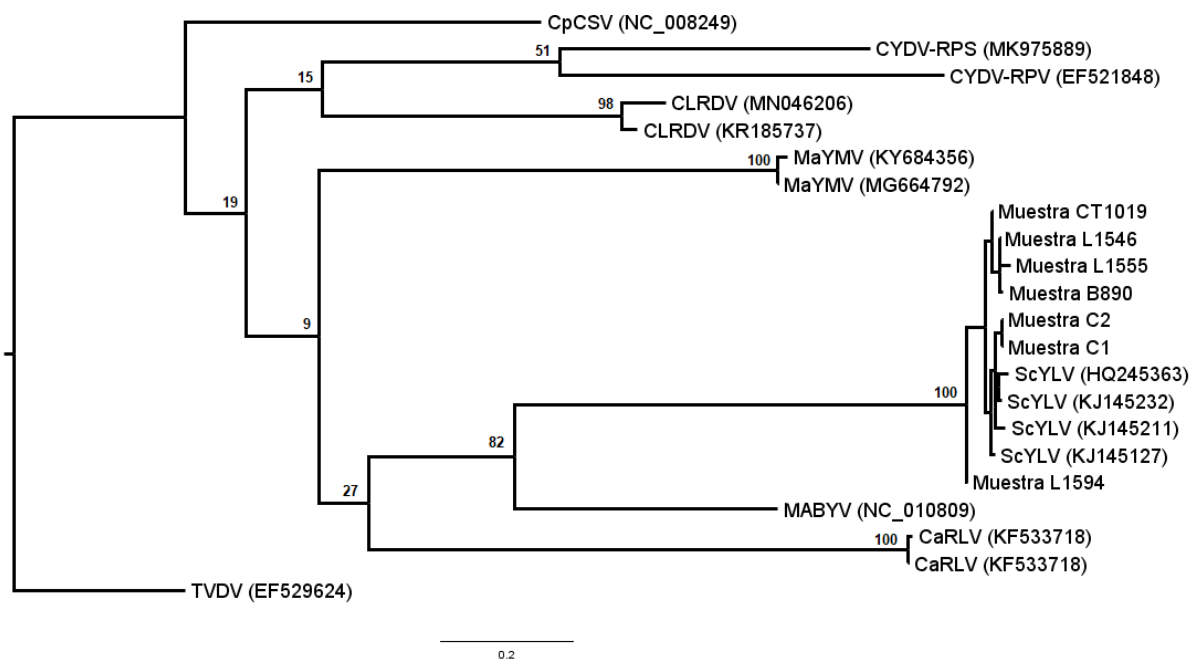


Figura 3. Topología de posicionamiento taxonómico entre secuencias de este estudio y secuencias del supresor del silenciamiento del ScYLV obtenidas del Genbank. Los números en las ramas es el valor de soporte bootstrap (1000 repeticiones). Los números de accesoión de las secuencias de la base de datos se muestran entre paréntesis, las muestras se encuentran con el código asignado en este estudio. La secuencia del TVDV fue designada como grupo externo.

También se elaboró un árbol de posicionamiento taxonómico, el cual agrupó las secuencias de este estudio con secuencias del ScYLV obtenidas de la base de datos GenBank (Figura 3), esta representación gráfica confirma la identidad de las secuencias,

correspondientes al ScYLV. Mediante la secuenciación del genoma completo también sería posible llevar a cabo la comparación filogenética con la diversidad existente entre las distintas regiones dentro de un país o incluso en otras regiones del mundo (ElSayed et al., 2011; Singh et al., 2011). El empleo de metodologías de secuenciación masiva y posterior ensamblaje, permiten analizar los genomas completos del ScYLV (tamaño aproximado de 6 kb) presentes en las variedades, para realizar la comparación filogenética.

Conclusiones

Se concluye que las técnicas moleculares como la RT-PCR y RT-qPCR, son considerablemente más sensibles que los inmunoensayos. De esta manera se reduce significativamente la propagación del virus a través de la reproducción de material infectado por bajas cargas virales. La detección temprana y eficaz, así como la correcta identificación del fitopatógeno son claves para el control y manejo adecuado de los cultivos.

Además fue posible estimar la carga viral presente en las muestras analizadas, esta herramienta posibilita llevar a cabo experimentos del nivel de tolerancia a la infección viral en variedades de caña de azúcar.

Identificación molecular de microorganismos contaminantes de medios de cultivo y de interés agronómico

Introducción

Los medios de cultivo utilizados para la propagación in vitro masiva, así como los sustratos empleados para la reproducción masiva de controladores biológicos, son altamente susceptibles a la contaminación por microorganismos, lo cual es alarmante, ya que puede afectar la producción, en caso de que no se tomen las medidas necesarias para controlar esta contaminación (Fang et al., 2012; Moreno et al., 2014).

Para esto, es imprescindible llevar a cabo una correcta identificación de las bacterias contaminantes de medios de cultivo, así como la detección de genes de resistencia a agentes antimicrobianos y estudiar la capacidad de formación de biofilm (capas de consorcios microbianos que confieren protección a efectos adversos del medio exterior y muchas otras ventajas de supervivencia), los cuales se caracterizan por ser altamente resistente a los métodos comunes de desinfección como el cloro y alcohol. Esto con el propósito de establecer herramientas de control más específicas y eficientes, así como

implementar el uso de antimicrobianos a los cuales no hayan desarrollado resistencia (Christaki et al., 2020).

Por otro lado, también se encuentran los microorganismos benéficos de plantas, por lo tanto, la bioprospección de microorganismos benéficos en la agricultura es sumamente importante (Singh et al., 2020). Este proceso se lleva a cabo en varias etapas: primeramente el aislamiento de los microorganismos, seguido de su identificación molecular; posteriormente análisis de expresión génica para una selección dirigida y astringente de los microorganismos con verdadero potencial benéfico. Finalmente, pruebas experimentales de patogenicidad, interacciones, aporte en el mejoramiento de la productividad, entre otras. En este estudio, se inició con la etapa de identificación, por ejemplo *Trichoderma* sp.

Los métodos convencionales para la identificación de microorganismos y los análisis de resistencia antimicrobiana, utilizan técnicas microbiológicas hasta lograr el aislamiento de las cepas, a partir de muestras ambientales u otras fuentes, para su posterior identificación tanto morfológica como bioquímica (Suanyuk et al., 2008). Asimismo, es importante confirmar las cepas obtenidas a través de su identificación molecular (Sebastião et al., 2015).

Para la detección y caracterización de bacterias se utiliza ampliamente el gen 16S ARNr (Fang et al., 2012), ya que contiene 9 regiones hipervariables, mientras que para hongos se utiliza el 18S (Stefani et al., 2020). Esa diversidad genética permite el diagnóstico específico, la identificación y la clasificación taxonómica de especies. Por lo tanto para caracterizar molecularmente las cepas bacterianas, generalmente se emplean cebadores 16S universales para bacterias y 18S para hongos (Chakravorty et al., 2007).

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue identificar cepas de microorganismos de interés, mediante técnicas moleculares.

Metodología

Para el análisis se utilizaron cepas microbianas aisladas y se realizó extracción de ADN en un buffer de extracción CTAB [2% p/v CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0; y 0.2% v/v b-mercaptoetanol] y Proteinasa K (0.1-0.4 mg/mL).

Para cada muestra de ADN obtenida se llevó a cabo la medición de la absorbancia a las siguientes longitudes de onda: 260, 280 y 230 nm respectivamente, empleando un espectrofotómetro UV-visible (Multiscan GO, Thermo Scientific). Para determinar la integridad del ADN, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con una solución amortiguadora TBE 1X (Tris 10 mM, Borato 20 mM, EDTA 1.0 mM, pH 8.0. El gel será teñido con GelRed (Biotium).

Para la amplificación por PCR de las bacterias, se emplearon los imprimadores 27f/1492, los cuales amplifican un fragmento de 1300 pb del gen 16S ARNr. Para los hongos,

fueron utilizados los cebadores ITS_1F/ITS_4 que amplifican un segmento de 600 pb del espaciador transcrito interno del ARNr (ITS).

Las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen final de 25µL, conteniendo 1X de Master Mix (ThermoScientific), 0.3 µM de cada imprimador y 50 ng de ADN. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Arktik, Thermo Scientific), bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial del ADN a 95 °C durante 3 min, 35 ciclos: 95 °C durante 30 seg, temperaturas de hibridación (55-64 °C) durante 1 min y 72 °C durante 1 min, con una extensión final de 10 min a 72 °C y finalmente almacenar a 4 °C. Para confirmar la amplificación, se visualizaron los productos mediante electroforesis en gel de agarosa 1.5%, TBE 1X.

La identidad de los amplicones obtenidos mediante PCR se confirmó mediante secuenciación (Macrogen, Korea). Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa Geneious v.R9 (Biomatters), posteriormente se analizaron a través del programa en línea BLASTn disponible en el NCBI y fueron comparadas con secuencias almacenadas en la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) para llevar a cabo la identificación.

Se realizó un análisis de taxonomía molecular mediante un alineamiento múltiple de secuencias utilizando el programa MAFFT 7.0, y por último, los árboles filogenéticos fueron elaborados mediante el programa raxmlGUI.

Resultados y discusión

En la Figura 3, se observan los productos PCR de las distintas muestras, los cuales fueron enviados a secuenciar. Se tomó como referencia el marcador de peso molecular, para determinar el tamaño molecular de cada amplicón y que coincidiera con el esperado.

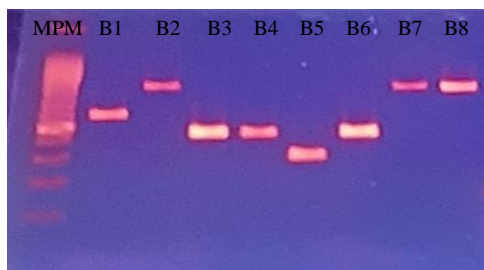


Figura 3. Amplificación de cepas aisladas de hongos y bacterias mediante los cebadores ITS_1F / ITS_4 y 27f/1492r, respectivamente, por PCR convencional.

El análisis mediante la herramienta BLASTn reveló que todas las secuencias obtenidas de la amplificación de las secuencias ITS y 16S fueron altamente homólogas (superiores al 99%) a secuencias accedidas al GenBank de las respectivas cepas (Cuadro 2).

En cuanto a las cepas del género *Trichoderma*, las tres muestras analizadas (muestras B3, B4 y B6) mostraron una similitud del 100% frente a cepas de *Trichoderma asperellum* almacenadas en el GenBank (KU059966, KC898194 y MG171157). Por otro lado, las levaduras aisladas a partir de medios de cultivo, de identidad desconocida (Muestras B1 y B5), presentaron similitud del 100% con una secuencia ITS de *Saccharomyces cerevisiae* (MN585904) y de *Candida rugosa* (EF198009), respectivamente.

Por último, dos de las cepas aisladas de individuos de *Diatraea* spp. caracterizados por una coloración oscura anormal, fueron identificadas como dos cepas distintas de *Serratia marcescens* (MK743984 y MT000032), los aislados bacterianos presentaban pigmentación diferente (color roja y color salmón), debido a la producción diferencial de pigmento (prodigiosina) por las diversas cepas que existen, generando variados tonos de rosado, incluso se han identificado cepas no pigmentadas (Zhou *et al.*, 2016). Se ha reportado en la literatura que *S. marcescens* es entomopatógena e infecta al barrenador de la caña de azúcar, por contaminación a través de alimentos, agua o superficies (Sikorowski *et al.*, 2001); además los parasitoides (*Cotesia*) contaminados también son capaces de transmitir la bacteria a sus hospederos (vectores) durante la etapa parasitaria, provocando la muerte de ambos (King *et al.*, 1975). *S. marcescens* causa septicemia en larvas y dependiendo la cepa que infecte, produce manchas rojo oscuro (cepas rojas) en las larvas o color café oscuro (cepas rosadas) y el resto de cepas causan que las larvas se tornen negras (Zhou *et al.*, 2016).

Finalmente, la última de las cepas (muestra 8) fue identificada como *Leucobacter chromiireducens* (NR_042287). La presencia de esta bacteria en individuos de *Diatraea* spp, se explica por la existencia de nematodos entomopatógenos (EPNs) que adquieren bacterias principalmente de los géneros: *Pseudochrobactrum* sp., *Comamonas* sp., *Alcaligenes* sp., *Klebsiella* sp., *Acinetobacter* sp., y *Leucobacter* sp; las cuales pasan a constituir parte del microbioma del nemátodo. Cuando los EPNs invaden al insecto, liberan estas bacterias a la hemolinfa, las cuales contribuyen a con la entomopatogenicidad y degradación del hospedero (Jiménez-Cortés *et al.*, 2016).

Código cepa control calidad	Código seq ADN	Primer	Resultados BLAST	Código de accesión GenBank	Porcentaje identidad
Levadura autoclavada	B1f	ITS_1F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain Y59	MN585904.1	100%
	B1r	ITS_4			
Bacteria Roja Diatraea	B2f	27f	<i>Serratia marcescens</i> strain SRG5 16S	MK743984.1	99.92%
	B2r	1492r			
Trichoderma	B3f	ITS_1F	<i>Trichoderma asperellum</i> isolate E-117	KU059966.1	100%
	B3r	ITS_4			
Trichoderma #31D0719-TR-SVE 2	B4f	ITS_1F	<i>Trichoderma asperellum</i> strain ASP5 18S	KC898194.1	100%
	B4r	ITS_4			
Frasco lechoso	B5f	ITS_1F	<i>Candida rugosa</i> strain 8	EF198009.1	100%
	B5r	ITS_4			
Trichoderma #56 harzianum INA	B6f	ITS_1F	<i>Trichoderma asperellum</i> isolate jz-3	MG171157.1	100%
	B6r	ITS_4			
Bacteria color salmón	B7f	27f	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i> strain XS 22-6	MT000032.1	99.92%
	B7r	1492r			
Bacteria clara	B8f	27f	<i>Leucobacter chromiireducens</i> strain L-1	NR_042287.1	100%
	B8r	1492r			

La identidad de los productos específicos amplificados de la secuencia ITS de hongos fue confirmada por un análisis de posicionamiento taxonómico, el cual agrupó las secuencias de este estudio con secuencias de *Trichoderma*, *Candida* y *Saccharomyces* obtenidas de la base de datos GenBank (Figura 5). Se observa que las tres cepas analizadas de *Trichoderma* se localizan dentro del clúster que contiene las secuencias de *T. asperellum*.

Cuadro 2. Identificación de aislados microbiológicos mediante secuenciación del gen 16S para bacterias e ITS para hongos.

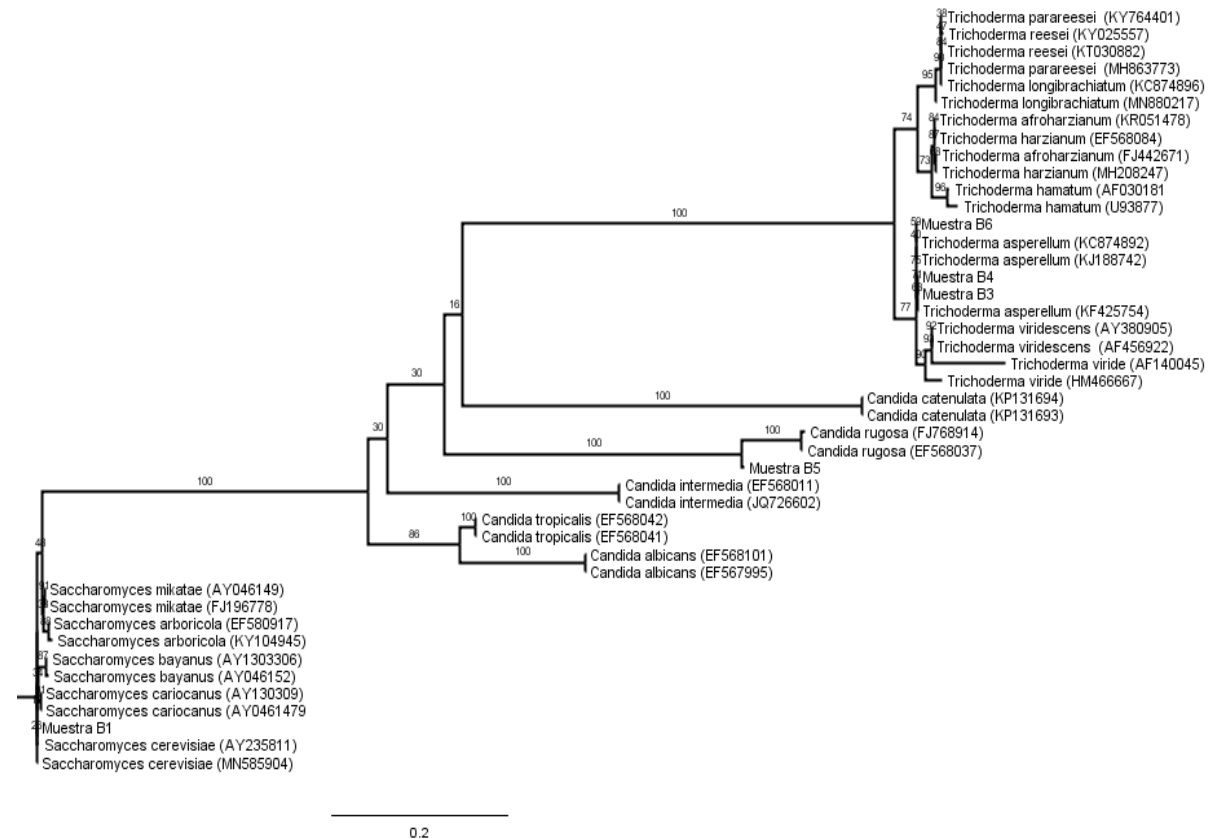


Figura 5. Topología de posicionamiento taxonómico entre secuencias de este estudio y secuencias ITS obtenidas del Genbank. El número en las ramas es el valor de soporte bootstrap (1000 repeticiones). Los números de accesoión de las secuencias de las bases de datos se muestran entre paréntesis, mientras que las muestras son: B1, B3, B4, B5 y B6.

Conclusiones

Se logró la identificación de los microorganismos analizados hasta el nivel de especie, con un porcentaje superior al 99%, mediante amplificación por PCR y secuenciación, empleando los cebadores universales, tanto del gen parcial 16S para identificación de bacterias, como la secuencia ITS de hongos.

La topología de posicionamiento taxonómico permitió confirmar la identificación de las cepas microbianas, agrupando las muestras con las secuencias de las especies respectivas.

Se recomienda llevar a cabo el análisis para las cepas de *Trichoderma*, secuenciando un fragmento de mayor tamaño, para que abarque más información.

Identificación molecular de especies del barrenador de la caña de azúcar (*Diatraea* spp.) en Costa Rica

Introducción

El barrenador de la caña de azúcar, *Diatraea* spp. (Lepidoptera: Crambidae) provoca graves pérdidas económicas a los productores, debido a que causa daños a la planta al introducirse y abrir galerías, estas múltiples aberturas propician la entrada de microorganismos oportunistas. Los túneles en los tallos interfieren con el transporte de nutrientes y la fotosíntesis, además favorece la ruptura de la dominancia apical. Estos factores provocan la degradación de la calidad y contenido de azúcar, así como una reducción en el peso de la caña (Simões, et al., 2015).

En Costa Rica se ha reportado la presencia de tres especies de *Diatraea*: *D. tabernella*, *D. guatemalaella* y *D. saccharalis*; cuya distribución abarca distintas regiones del país donde se cultiva la caña de azúcar (Badilla-Fernández, 2002). Históricamente, la identificación taxonómica se ha realizado con base en las características externas y morfometría; sin embargo, se han detectado especies crípticas en diversas regiones de América, producto de la gran diversidad de especies del barrenador y del hospedero. Además muchas especies son indistinguibles basándose únicamente en caracteres fenotípicos, la dificultad y características utilizadas para la identificación también varía en función del estadio de desarrollo (Barrera et al., 2017). Todos estos factores conllevan a errores de identificación taxonómica; ventajosamente, con el advenimiento de los avances en biología molecular, es posible una identificación más precisa con base en análisis de la secuencia del ADN, con el potencial de identificar hasta el nivel de especie, en cualquier estadio de desarrollo.

Considerando lo anterior, el objetivo de este trabajo fue identificar las especies de barrenadores (*Diatraea* spp.) colectadas en las distintas regiones agroindustriales de caña de azúcar en Costa Rica, mediante técnicas de PCR y secuenciación.

Metodología

Para el análisis de identificación molecular de las especies de *Diatraea* spp., se utilizaron especímenes (larvas y adultos) colectados por funcionarios del Programa de Control Integrado de Plagas de DIECA, en las siguientes regiones de Costa Rica: Región Central Occidental (Grecia), Región Central Oriental (Juan Viñas y Turrialba), Región Chorotega (Liberia y Cañas), Región Brunca (Pérez Zeledón), Región Huetar Norte (Los Chiles, San Carlos) y Región Pacífico Central (Azucarera El Palmar).

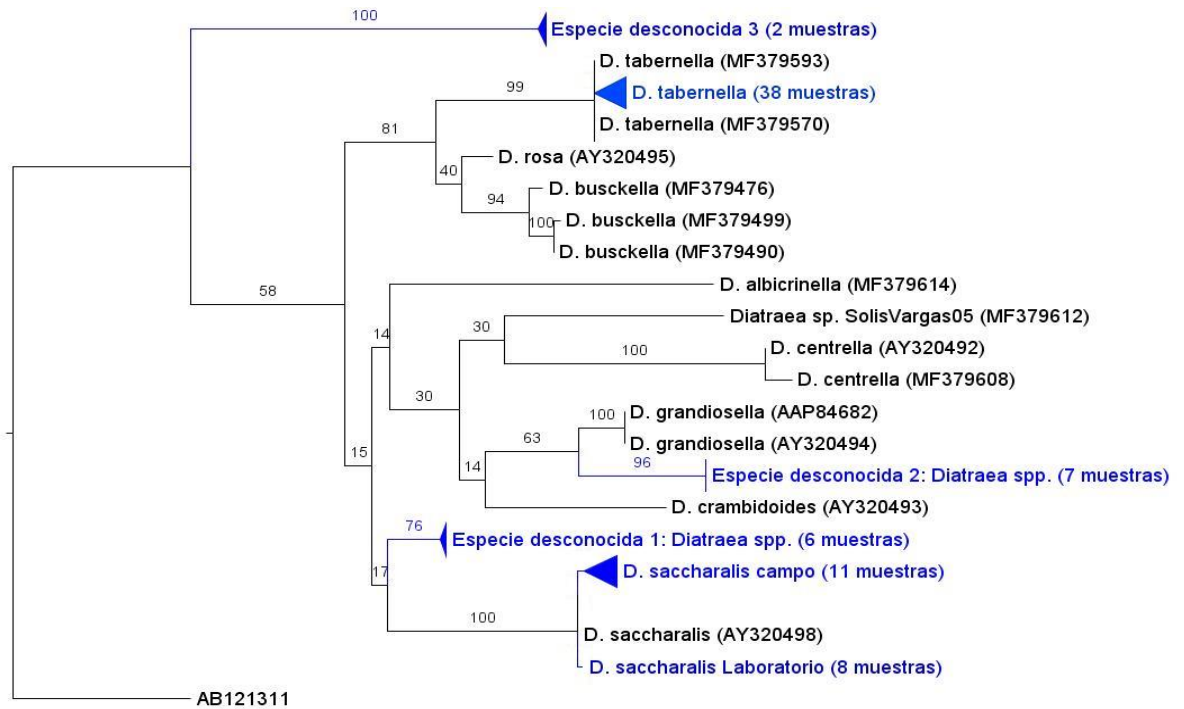
Para la identificación molecular de los especímenes, se realizó extracción de ADN en un buffer CTAB [2% p/v CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0; y 0.2% v/v b-mercaptoetanol] y Proteinasa K (0.1-0.4 mg/mL), además de un tratamiento con RNasa (0.2 mg/mL). El ADN extraído fue cuantificado por espectrofotometría y visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa.

Se llevaron a cabo amplificaciones por PCR de un fragmento específico del gen citocromo oxidasa II (COII) en condiciones estándar (volumen final 25 µL) utilizando Dream Taq Master Mix (Thermo Scientific), 1 ng de ADN molde y los cebadores previamente reportados y utilizados en *Diatraea*: A-298 (5'-ATTGGACATCAATGATATTGA-3') y B-tLYS (5' GTTTAAGAGACCAGTACTTG-3'). Posteriormente, se envió a secuenciar los productos de PCR por el método Sanger (Macrogen, Korea). Las secuencias obtenidas fueron editadas mediante el programa bioinformático Geneious v.R9 (Biomatters), y luego fueron comparadas con secuencias almacenadas en la base del GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI) mediante la herramienta en línea BLASTn. Finalmente, se construyó un árbol de posicionamiento taxonómico mediante la herramienta RAxML-HPC2 on XSEDE de la plataforma en línea CIPRES. La visualización y edición del árbol se realizó con FigTree v.1.4.2.

Resultados y discusión

Los análisis permitieron confirmar mediante técnicas moleculares de secuenciación de ADN, por primera vez en Costa Rica, dos especies del barrenador de la caña de azúcar del género *Diatraea*: *D. saccharalis* y *D. tabernella*, con porcentajes de identidad superiores al 99%.

En el país se han reportado tres especies del barrenador de la caña de azúcar: *D. tabernella*, *D. guatemalella* y *D. saccharalis*. No obstante, la totalidad de los individuos identificados por técnicas moleculares como *D. tabernella*, se encontraban previamente reportados como *D. guatemalella*, según las características morfológicas observadas. Mientras que el análisis de secuencias de los especímenes previamente identificados por morfología como *D. tabernella*, mostró que ninguna de las secuencias coincidió con dicha especie, ni tampoco con secuencias COII de otras especies, por esta razón, fueron preliminarmente clasificadas como “especie desconocida 1” (Figura 6).



0.04

Figura 6. Topología de posicionamiento taxonómico entre secuencias de este estudio y secuencias del gen COII de *Diatraea* spp. obtenidas del Genbank. El número en las ramas es el valor de soporte bootstrap (1000 repeticiones). Los números de accesión de las secuencias de las bases de datos se muestran entre paréntesis, mientras que las muestras se encuentran resaltadas en color azul.

Con base en los resultados anteriormente expuestos, se demostró la relevancia de confirmar la identidad de los individuos del género *Diatraea* spp. mediante análisis de ADN; esto debido a que muchas especies son indistinguibles basándose únicamente en caracteres morfológicos, además se han observado especies crípticas producto de la gran diversidad de especies del barrenador y del hospedero. (Barrera et al., 2017).

Asimismo, tres de las especies colectadas, permanecen como desconocidas, las mismas fueron agrupadas en los clados denominados como: "especie desconocida 1: *Diatraea* spp.", "especie desconocida 2: *Diatraea* spp." y "especie desconocida 3" (Figura 6). En el árbol de posicionamiento taxonómico es posible visualizar la cercanía taxonómica entre "especie desconocida 2: *Diatraea* spp." y *D. grandiosella*.

La imposibilidad de identificación de algunas especies, se debe a que las secuencias de ADN correspondientes a todas las muestras fueron comparadas con la base de datos del GenBank, con el propósito de encontrar similitudes. Es decir, las secuencias de este estudio que no coincidieron con ninguna de las secuencias almacenadas en la base de datos es porque aún no se ha accedido a secuencias del gen COII correspondientes a esas especies.

Por lo tanto, es necesario complementar los resultados obtenidos en el presente estudio basado en la secuenciación de un fragmento del gen COII, con otro análisis de un gen diferente. Además se requiere realizar un estudio morfométrico de los lóbulos laterales del tegumen de los genitales masculinos de adultos (Barrera et al., 2017), con el propósito de identificar las especies desconocidas y acceder a las secuencias correspondientes a la base de datos.

En el Centro de Investigación de Caña de Azúcar en Colombia (CENICAÑA), llevan a cabo la identificación taxonómica de los barrenadores, con base en estudios morfométricos de los genitales y pruebas moleculares (secuenciación del gen citocromo oxidasa II y análisis SSCP), esta metodología fue efectiva para la identificación de 7 especies diferentes en Colombia (incluyendo una nueva especie: *Diatraea SolisVargas05*) (Barrera et al., 2017).

La especie *D. tabernella* fue identificada en todas las regiones del país, mientras que las muestras identificadas como *D. saccharalis* fueron encontradas en Liberia y San Carlos. Además, las muestras agrupadas en el clado “especie desconocida 1: *Diatraea* spp.”, fueron colectadas en la Región Central Oriental (Juan Viñas y Turrialba), los individuos agrupados en “especie desconocida 2: *Diatraea* spp.” se localizaron en la zona de San Carlos, y las muestras correspondientes al clado “especie desconocida 3”, se encontraron en la Región Central Occidental (Grecia).

Conclusiones

Se concluye que las técnicas moleculares representan una herramienta sumamente útil para confirmar las clasificaciones taxonómicas basadas en morfología. Además abre la posibilidad de encontrar nuevas especies o especies que no se habían reportado previamente.

Esta información es de gran importancia, para ejercer un control más eficiente y específico de las especies de esta plaga, aunado con la información sobre la distribución en las distintas regiones del país.

Según los resultados preliminares, se confirmó la presencia e identidad de *D. saccharalis* y *D. tabernella*, mientras que tres especies permanecen desconocidas.

Evaluación de marcadores moleculares tipo microsatélites (SSR) para la diferenciación de dos variedades de caña de azúcar (*Saccharum* spp.)

Introducción

El enfoque tradicional para la identificación de variedades de caña de azúcar se basa en un conjunto de descriptores morfo-agronómicos que implica la observación y el registro de caracteres morfológicos (Singh et al., 2015). Con el advenimiento de la biología molecular, se han desarrollado marcadores moleculares para la identificación de variaciones a nivel de secuencias cortas del ADN entre individuos de la misma especie, lo que convierte la técnica en altamente precisa (Azofeifa-Delgado, 2006; Singh et al., 2015).

La principal desventaja del uso exclusivo de marcadores fenotípicos, es que éste no refleja el potencial o diversidad genética, por esta razón, es posible encontrar plantas con el mismo fenotipo que contengan alelos distintos en uno o más genes, así como también, individuos con los mismos alelos, pueden expresar distintos fenotipos debido a la influencia de la epigenética durante el desarrollo y factores ambientales o fenológicos (plasticidad fenotípica) (Azofeifa-Delgado, 2006). Es importante llevar a cabo la identificación con base en la información fenotípica, así como en la información genética, la cual se puede obtener mediante el empleo de marcadores moleculares altamente informativos, como por ejemplo los microsatélites.

Los microsatélites o Secuencias Simples Repetidas (SSR, por sus siglas en inglés “Short Single Repeats”) son secuencias cortas de ADN distribuidas a lo largo del genoma, las cuales contienen números variables de repeticiones en tándem, pueden estar o no asociados a genes (Azofeifa-Delgado, 2006). Son loci altamente variables y mutables, poseen amplia cobertura por todo el genoma, además son codominantes y se pueden detectar múltiples alelos (Ahmad et al., 2018; Tokarska et al., 2009, Tew & Pan, 2010). Esta técnica presenta ventajas importantes sobre otras técnicas menos costosas técnica y operativamente, que se utilizan para el mismo fin, tales como RFLP, AFLP y RAPD. En primer lugar, los SSR son codominantes, es decir, permiten la distinción entre homocigotos y heterocigotos, ya que detecta todos los alelos presentes, obteniendo mayor información genética para identificar diferencias mínimas entre las secuencias de individuos genéticamente cercanos, así como información sobre el nivel y dispersión de la variabilidad genética (Azofeifa-Delgado, 2006).

Asimismo, la hipervariabilidad de estos marcadores entre especies o variedades muy relacionadas, los convierte en altamente informativos y aptos para la caracterización, identificación o diferenciación de variedades, selección de padres, introgresión de rasgos deseables, determinación de paternidad, caracterización y clasificación de colecciones de

germoplasma (Ahmad et al., 2018). Esta técnica es sumamente útil para el mejoramiento asistido de variedades de caña de azúcar, al generar información sobre la diversidad alélica de la población, la cual se utiliza para la selección de progenitores élite y llevar a cabo el proceso de cruzamiento, con el propósito de obtener una progenie mejorada y altamente variable para contribuir a la diversidad genética de la población (Singh et al., 2015).

El objetivo de este estudio fue evaluar marcadores para microsatélites (SSR) diseñados previamente en caña de azúcar, para su aplicación en la diferenciación molecular de variedades del género *Saccharum* spp.

Metodología

Se utilizaron las variedades especificadas en el Cuadro 3, para llevar a cabo el análisis de diferenciación mediante marcadores moleculares.

Cuadro 3. Variedades de *Saccharum* spp. seleccionadas para llevar a cabo el análisis de diferenciación mediante marcadores moleculares.

Variedad	Número de individuos	Progenitor femenino	Progenitor masculino	Procedencia	Parcela	Uso del material
LAICA 00-301	5	CTC 93-811	Policruce	El Porvenir	Área de Floración	Cruzamiento sexual
B 82-333	5	Desconocido	Desconocido	El Porvenir	Área de Floración	Cruzamiento sexual
Q96	5	Q 63	Q 68	El Porvenir	Área de Floración	Cruzamiento sexual
B 74-132	5	Desconocido	Desconocido	UTN	Banco de Germoplasma	Conservación de recurso fitogenético
Desconocida	6	Desconocido	Desconocido	Ingenio Juan Viñas	Finca La Gloria	Comercial
LAICA 07-27	9	Q 138	Policruce	El Porvenir	Área de Floración	Cruzamiento sexual
RB 86-7515	6	RB 72-454	Policruce	El Porvenir	Área de Floración	Cruzamiento sexual

De cada variedad se seleccionaron entre cinco y nueve individuos al azar, de los cuales se tomaron muestras de hojas jóvenes y sanas, sin considerar la posición en la planta. Se cortó un fragmento de lámina de cada planta dentro de un tubo de microcentrífuga conteniendo etanol absoluto y se almacenaron a 4°C para evitar la degradación de la muestra. Posteriormente, fue extraída una muestra de 100 mg y colocada dentro de otro tubo de microcentrífuga para dejar congelando a -80°C. Una vez congeladas, las muestras fueron maceradas con un disruptor mecánico (MM400, Retsch).

Las muestras pulverizadas se utilizaron directamente para la extracción de ADN total en un buffer de extracción CTAB [2% p/v CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0; y 0.2% v/v b-mercaptoetanol] y Proteinasa K (0.1-0.4 mg/mL) y tratamiento con RNasa (0.2 mg/mL).

Para cada muestra de ADN obtenida se llevó a cabo la medición de la absorbancia a las siguientes longitudes de onda: 260, 280 y 230 nm respectivamente, empleando un espectrofotómetro UV-visible (Multiscan GO, Thermo Scientific). Para evaluar la integridad del ADN, se realizó electroforesis en gel de agarosa.

Se evaluaron 15 de los cebadores para microsatélites previamente mapeados para la caña de azúcar por el Consorcio Internacional de Microsatélite de Caña de Azúcar (Cordeiro et al., 2000; Singh et al., 2008; Oliveira et al., 2009). Primeramente, se procedió a optimizar las reacciones de amplificación, para esto, fueron preparados 10 conjuntos de cinco genotipos distintos cada uno. Se seleccionaron los 11 marcadores más polimórficos y que amplificaron para todas las muestras (Cuadro 4).

Cuadro 4. Cebadores para microsatélites previamente mapeados para la caña de azúcar por el Consorcio Internacional de Microsatélite de Caña de Azúcar.

Marcador SSR	Secuencia Forward	Secuencia Reverse	Concentración de imprimador (μ M)	Temperatura de alineamiento ($^{\circ}$ C)	PIC
mSSCIR14	GAT TGT TTT TCC CCC ACT A	CAC CTT GTT CTT GCT TTA CTC	0.2	54	0.87
SMC1572CL	GAG GAT ATG GTT TTC ATT GCC	ACA CCT TCT CAC CAC TTA GGT TC	0.2	57.5	0.86
SMC334BS	CAA TTC TGA CCG TGC AAA GAT	CGA TGA GCT TGA TTG CGA ATG	0.2	58	0.88
SMC597CS	GCA CAC CAC TCG AAT AAC GGA T	AGT ATA TCG TCC CTG GCA TTC A	0.2	62	0.88
SMC869CG	CTT GTT GTT TAT TAG GGT TCG TCT G	TGA GCG TTG TGC TTT CAT TT	0.2	57	0.82
SMC17CG	AAG GTA GCA CGA AAC ACG TCG AT	AAC CCC AGC GGC GAT CTC T	0.2	65	0.88
SMC1493CL	CGA TGA GTA AAT GGG CAG C	GAT ATA GAG GAA GGG ATT GAA GG	0.2	54	0.81
mSSCIR70	ATT GGA TTC CTT CTG CTA	AGG TTT CAG TAT ATT TAT TCC	0.2	49	0.81
mSSCIR54	CGA AGG ACC AGT TGA AAG	GGG TAA TGG AAC AGG ACA	0.2	54.5	0.88
SMC336BS	ATT CTA GTG CCA ATC CAT CTC A	CAT GCC AAC TTC CAA ACA GAC	0.2	58	0.86
mSSCIR 67	GAC TGA GTA TTG GCT TGG	GCT TCT TCT TTG GTC GTT	0.2	52	0.89

PIC: Porcentaje de Información Polimórfica

Las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen final de 20 μ L, conteniendo 10 μ L de Dream Taq Master Mix 2X (ThermoScientific), 0.7 μ M de cada imprimador y 50 ng de ADN. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Arktik, Thermo Scientific), bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial del ADN a 94 °C durante 5 min, con 35 ciclos: 94 °C durante 30 seg, temperatura de hibridación durante 30 s y 72 °C durante 30 s, con una extensión final de 10 min a 72 °C y finalmente almacenar a 4 °C. Para confirmar la amplificación, se visualizaron los productos mediante electroforesis en gel de agarosa 1.5%, TBE 1X.

La visualización de los posibles alelos en los productos de PCR, se realizó por electroforesis capilar en un sistema de alta resolución QIAxcel Advanced (QIAGEN, USA) ubicado en el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM-UCR). El tamaño de cada locus amplificado se determinará con el programa computacional QIAxcel ScreenGel v1.0.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa informático R Studio para obtener el porcentaje de información polimórfica y se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para detectar las relaciones genéticas entre las poblaciones. Se utilizó el análisis de varianza molecular (AMOVA) para estimar los componentes de la varianza y sus niveles de importancia de la variación genética dentro y entre las poblaciones, basada en 99 permutaciones, mediante el mismo programa.

Para inferir la estructura de la población y estimar los grupos genéticamente homogéneos (K) que mejor se ajustan a los datos, se implementó el Método Bayesiano en STRUCTURE versión 2.3.4 [56], asumiendo la existencia de grupos K, caracterizados por un conjunto de frecuencias alélicas para cada locus. Se adoptó un modelo de mezcla y el modelo de correlación de frecuencias alélicas, sin supuestos previos sobre la población. El número de K se estableció de 1 a 6, y se realizaron diez corridas independientes, cada una con una cadena de Markov Monte Carlo (MCMC) de 100.000 repeticiones y 50.000 iteraciones. Para identificar el valor óptimo de K, el archivo de salida STRUCTURE se implementó en Structure Harvester.

Resultados y discusión

Se evaluaron en total 15 marcadores para la diferenciación de 7 variedades (40 muestras) del género *Saccharum* spp., con el propósito de seleccionar los marcadores altamente polimórficos. En la Figura 7 se muestra un ejemplo de los electroferogramas obtenidos a partir de dos muestras correspondientes a dos variedades distintas de caña de azúcar, donde se observan perfiles alélicos distintos.

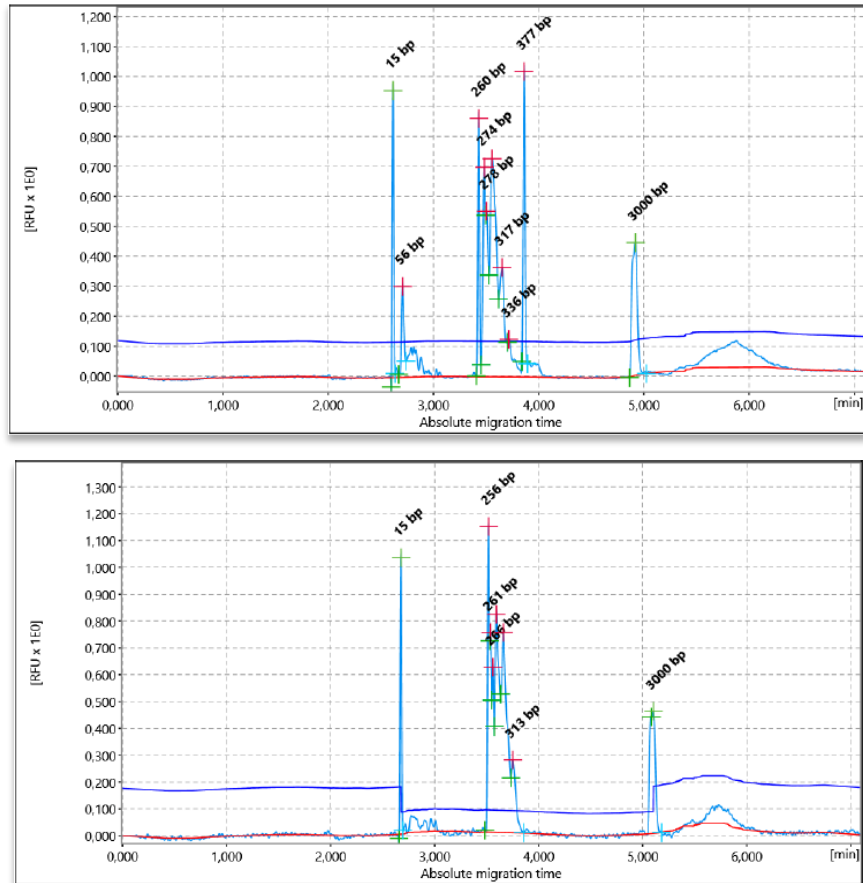


Figura 7. Ejemplo representativo de los electroferogramas obtenidos a partir de la electroforesis capilar de alta resolución para dos variedades diferentes.

Lo anterior fue consistente con el Índice de Contenido Polimórfico (PIC) de los marcadores utilizados, los valores encontraron en un rango entre 0,81 a 0,89, con un promedio de 0,86 (Cuadro 4). Es evidente que este grupo de marcadores son bastante informativos para las variedades de caña de azúcar analizadas en este estudio, como se esperaba, ya que estos imprimadores se seleccionaron por ser polimórficos en otros estudios con caña de azúcar. Por lo tanto, es posible afirmar que este conjunto de marcadores son altamente polimórficos y son bastante efectivos, ya que permiten diferenciar claramente entre las variedades.

El resultado del análisis de varianza molecular (AMOVA) para las variedades de LAICA 00-301 y B 82-333 ($\Phi_{pt} = 0.1101695$) reveló que existe una proporción muy baja (11.01695%) de la diferenciación genética entre poblaciones y esas diferencias no resultaron significativas ($p = 0,08$) (Cuadro 5). Por lo tanto, se podría considerar la probabilidad de que ambas pertenezcan a la misma variedad.

Cuadro 5. Análisis molecular de varianza (AMOVA) para las variedades de LAICA 00-301 y B 82-333.

SV	d.f.	SSD	MSD	VC	TVP	Φ_{pt}	p (rand \geq data)
Entre poblaciones	1	3.4	3.400000	0.26	11.01695%	0.1101695	0.08
Dentro de poblaciones	8	16.8	2.100000	2.10	88.98305%		
Total	9	20.2	2.244444	2.36	100.00000%		

SV: fuente de variación; d.f.: grados de libertad; SSD: suma de cuadrados; MSD: media de cuadrados; VC: componente de varianza; TVP: porcentaje de varianza total; Φ_{pt} : proporción de la varianza total entre poblaciones.

El resultado del análisis de varianza molecular (AMOVA) para las variedades de Q96 y B 74-132 ($\Phi_{pt} = 0.1284404$) reveló que existe una proporción muy baja (0.1284404%) de la diferenciación genética entre poblaciones y esas diferencias no resultaron significativas ($p = 0,12$) (Cuadro 6). Por lo tanto, se podría considerar la probabilidad de que ambas pertenezcan a la misma variedad.

Cuadro 6. Análisis molecular de varianza (AMOVA) para las poblaciones de Q96 y B 74-132.

SV	d.f.	SSD	MSD	VC	TVP	Φ_{pt}	p (rand \geq data)
Entre poblaciones	1	3.3	3.300000	0.28	12.84404%	0.1284404	0.12
Dentro de poblaciones	8	15.2	1.900000	1.90	87.15596%		
Total	9	18.5	2.055556	2.18	100.00000%		

SV: fuente de variación; d.f.: grados de libertad; SSD: suma de cuadrados; MSD: media de cuadrados; VC: componente de varianza; TVP: porcentaje de varianza total; Φ_{pt} : proporción de la varianza total entre poblaciones.

El resultado del análisis de varianza molecular (AMOVA) para las variedades de LAICA 07-27 y desconocida de Juan Viñas ($\Phi_{pt} = 0.8717305$) reveló una gran proporción de la diferenciación genética entre poblaciones, y las diferencias entre poblaciones fueron significativas ($p = 0,01$) (Cuadro 7). Por lo tanto, la probabilidad de que pertenezcan a variedades diferentes es muy alta. Es decir, se descarta la posibilidad de que la identidad de la variedad desconocida de Juan Viñas sea LAICA 07-27.

Cuadro 7. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para las poblaciones de LAICA 07-27 y desconocida de Juan Viñas.

SV	d.f.	SSD	MSD	VC	TVP	Φ_{pt}	p (rand \geq data)
Entre poblaciones	1	150.22222	150.222222	20.446344	87.17305%	0.8717305	0.01
Dentro de poblaciones	13	39.11111	3.008547	3.008547	12.82695%		
Total	14	189.33333	13.523810	23.454891	100.00000%		

SV: fuente de variación; d.f.: grados de libertad; SSD: suma de cuadrados; MSD: media de cuadrados; VC: componente de varianza; TVP: porcentaje de varianza total; Φ_{pt} : proporción de la varianza total entre poblaciones.

El resultado del análisis de varianza molecular (AMOVA) para las variedades de RB 86-7515 y desconocida de Juan Viñas ($\Phi_{pt} = 0.8594846$) reveló una gran proporción de la diferenciación genética entre poblaciones (8594846%), y las diferencias entre poblaciones fueron significativas ($p = 0,01$) (Cuadro 8). Por lo tanto, la probabilidad de que pertenezcan a variedades diferentes es muy alta. Es decir, se descarta la posibilidad de que la identidad de la variedad desconocida de Juan Viñas sea RB 86-7515.

Cuadro 8. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para las poblaciones de RB 86-7515 y desconocida de Juan Viñas.

SV	d.f.	SSD	MSD	VC	TVP	Φ_{pt}	p (rand \geq data)
Entre poblaciones	1	106.05556	106.055556	14.402896	85.94846	0.8594846	0.01
Dentro de poblaciones	13	30.61111	2.354701	2.354701	14.05154		
Total	14	136.66667	9.761905	16.757597	100.00000		

SV: fuente de variación; d.f.: grados de libertad; SSD: suma de cuadrados; MSD: media de cuadrados; VC: componente de varianza; TVP: porcentaje de varianza total; Φ_{pt} : proporción de la varianza total entre poblaciones.

El análisis de componentes principales (PCA) mostró un traslape entre las variedades LAICA 00-301 y B 82-333, así como también, entre las variedades Q96 y B 74-132, lo que coincide con los resultados obtenidos en el AMOVA. Mientras que se muestra una clara separación entre esos dos grupos y las variedades de desconocida de Juan Viñas, LAICA 07-27 y RB 86-7515. El análisis de componentes principales de las siete variedades, representó

el 37,3% (primer eje) y el 23,3% (segundo eje) de la varianza total, respectivamente (Figura 8).

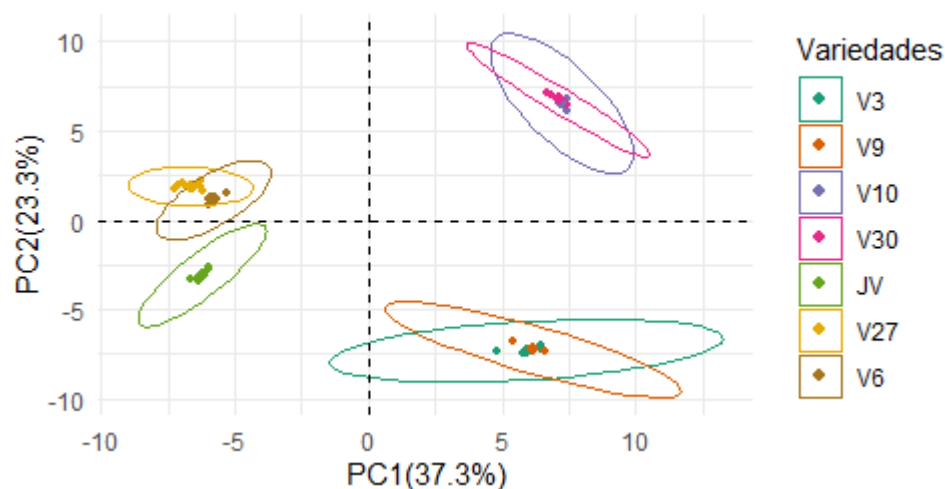


Figura 8. Análisis de Componentes principales (PCA) de siete variedades de caña de azúcar basado en los dos ejes principales (primer eje = 37,3%, segundo eje = 23,3%). **V3:** LAICA 00-301, **V9:** B 82-333, **V10:** Q96, **V30:** B 74-132, **JV:** desconocida de Juan Viñas, **V27:** LAICA 07-27, **V6:** RB 86-7515.

Fue utilizado el programa Structure para inferir la estructura de la población y estimar los grupos genéticamente homogéneos, como se evidencia en la Figura 9, las siete variedades se agruparon en cinco grupos genéticos: LAICA 00-301 y B 82-333 (clúster amarillo); Q96 y B 74-132 (clúster naranja); desconocida de Juan Viñas (clúster rojo); LAICA 07-27 (clúster verde); RB 86-7515 (clúster morado). Consistente con los resultados obtenidos en los análisis AMOVA.

Lo anterior se confirmó mediante el programa Structure harvester, que emplea el método de Evanno para determinar el número de grupos genéticos que mejor se ajusta a los datos, se graficó el número de conglomerados (K) frente a Delta K (ΔK) (Figura 10), que reveló un pico agudo en el valor de ΔK (8,89) en $K = 5$. Por lo tanto, $K = 5$ se ajusta mejor a los datos. Hay una alta probabilidad de la presencia de 5 poblaciones.

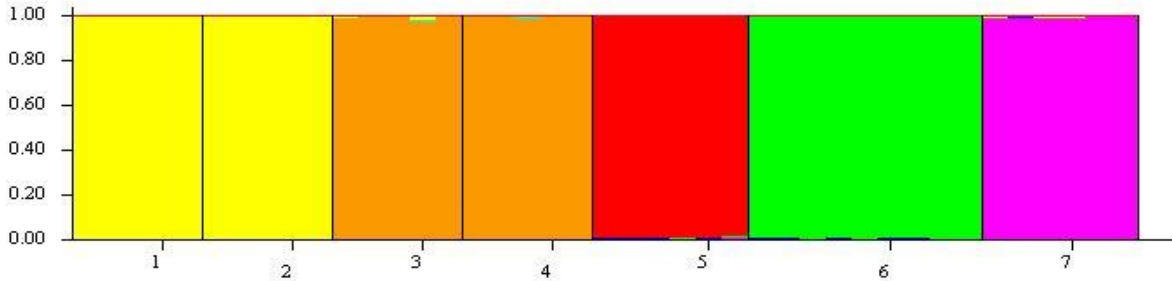


Figura 9. Estructura poblacional de siete variedades de *Saccharum* spp., utilizando el Programa Structure. **1:** LAICA 00-301, **2:** B 82-333, **3:** Q96, **4:** B 74-132, **5:** desconocida de Juan Viñas, **6:** LAICA 07-27, **7:** RB 86-7515.

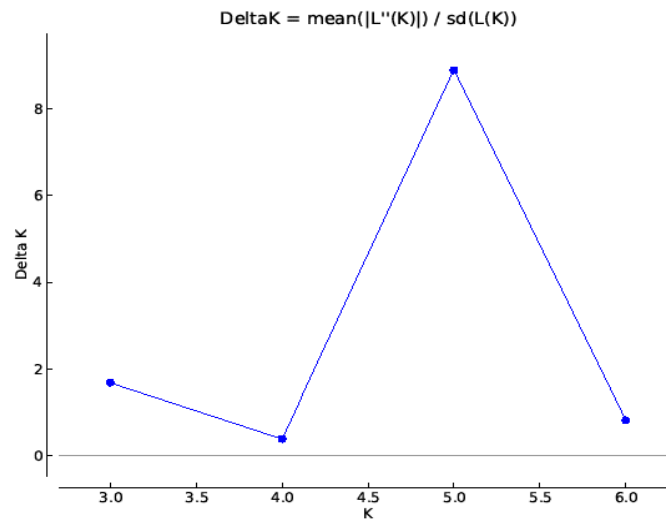


Figura 10. Resultados del análisis de asignación bayesiana utilizando el Structure Harvester.

Cabe destacar la importancia de la técnica seleccionada para detectar las diferencias alélicas entre las variedades, de forma eficiente y precisa. Dentro de las técnicas más comunes utilizadas para este fin, se encuentra la separación de fragmentos mediante geles desnaturalizantes de poliacrilamida, caracterizada por poseer la más baja reproducibilidad y resolución; así como, la más básica, sencilla y menos costosa (Singh et al., 2008). Con el avance en las tecnologías empleadas en biología molecular, dirigidas a incrementar la sensibilidad y precisión del análisis, es posible separar los alelos mediante un analizador genético automatizado, similar a la técnica utilizada en este estudio de electroforesis capilar de alta resolución, la cual posee un poder de resolución de 3-5 pb. No obstante, se pierde información al no tener la capacidad de separar fragmento con diferencias de tamaños inferiores, además presenta variación entre repeticiones. Es por esta razón que, en la

actualidad, con frecuencia se utiliza una técnica más precisa denominada análisis de fragmentos, con un poder de resolución de 1 pb, mediante el uso de imprimadores marcados con fluorescencia (Tew et al., 2010)

Por último, la estrategia más tecnológica, novedosa, costosa y efectiva, se encuentra la secuenciación de próxima generación (Harris et al., 2017), desarrollada con el fin de conocer la secuencia de los alelos, debido a que existe la posibilidad de encontrar alelos del mismo tamaño, pero con diferencias a nivel de secuencia.

Como se indicó anteriormente, la técnica de electroforesis de alta resolución utilizada en este estudio, permitió obtener resultados preliminares en cuanto al nivel de diferenciación entre variedades. Sin embargo, no fue posible afirmar con completa certeza el hecho de que las variedades LAICA 00-301 y B 82-333 pertenecen a la misma población, de igual forma que con el caso de Q96 y B 74-132. Por esta razón, se tiene proyectado confirmar estos hallazgos mediante análisis de fragmentos y secuenciación de nueva generación.

Conclusiones

Los 11 marcadores seleccionados para la diferenciación de variedades fueron altamente polimórficos, por lo tanto, se consideran aptos para posteriores proyectos de caracterización molecular.

Se obtuvieron resultados preliminares sobre las diferencias a nivel molecular entre variedades, no obstante, no fue posible afirmar con completa certeza el hecho de que las variedades LAICA 00-301 y B 82-333 pertenecen a la misma población, de igual forma que con el caso de Q96 y B 74-132.

Los marcadores moleculares serán utilizados para llevar a cabo la diferenciación y caracterización molecular mediante análisis de fragmentos y secuenciación de nueva generación, para obtener resultados información más completa y precisa.

Diagnóstico molecular de la infección por Nosemosis en el proceso de producción del controlador biológico *Cotesia flavipes*

Introducción

El barrenador de la caña de azúcar, *Diatraea* spp. (Lepidoptera: Crambidae) provoca graves pérdidas económicas a los productores, Por lo tanto, se ha implementado el control biológico mediante *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae), un endoparásitoide cenobionte de larvas de *Diatraea* spp. Este parasitoide presenta la ventaja de fácil producción bajo condiciones de laboratorio para su posterior liberación al campo (Freitas et al., 2018).

Para propagar este controlador biológico a nivel de laboratorio, se requiere la producción masiva del hospedero respectivo; este proceso se ha visto influenciado negativamente por la Nosemosis que infecta las larvas de *Diatraea* spp. utilizadas para la propagación masiva de *C. flavipes* en laboratorio. (Simões et al. 2012). La Nosemosis es una enfermedad causada por especies del género *Nosema* (Microsporidia: Nosematidae), un grupo de parásitos intracelulares obligados, asociados principalmente a los órdenes Lepidoptera e Hymenoptera (Chen et al., 2009, Keeling & Fast 2002).

Se ha comprobado que los parasitoides desarrollados en larvas infectadas presentan un incremento en la duración de las etapas pupal y larval, disminución en la longevidad y fertilidad de los adultos, reducción del tamaño, diferencias de comportamiento. (Simões et al., 2012). Este parásito alcanza e infecta la capa epitelial del intestino medio, existen dos vías de transmisión: horizontal y vertical, la primera se da por ingestión de las esporas en el alimento o agua, por lo tanto es la más común. La transmisión vertical ocurre cuando las hembras infectadas transmiten el patógeno a su progenie; así como también a la descendencia producto del apareamiento entre una hembra sana y un macho infectado, aunque es poco probable (Simões et al., 2015).

Los síntomas macroscópicos de la Nosemosis incluyen: retención de la cápsula cefálica y la epidermis vieja durante la muda, hinchazón de la región abdominal posterior con una coloración blanca característica, manchas necróticas, reducción considerable del crecimiento por alimentación reducida, entre otros (Simões et al., 2015). Sin embargo, la enfermedad puede presentarse de forma asintomática, ya que muchos microsporidios no producen una actividad insecticida inmediata (Hernández-Velázquez et al., 2012).

Para llevar a cabo la reproducción exitosa del parasitoide, es necesario garantizar la sanidad del hospedero, mediante el diagnóstico temprano de la Nosemosis. El método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es ampliamente utilizado para la detección e identificación de microsporidios mediante análisis de ADN (Kyei-poku et al., 2008; Zhu et al., 2010). Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue optimizar un protocolo para la detección molecular temprana del microsporidio *Nosema* spp. mediante PCR punto final, como control de calidad para la producción de un parasitoide controlador biológico.

Metodología

El análisis de rutina para la detección de *Nosema* spp. se lleva a cabo de forma semanal, el flujo de trabajo que inicia con la extracción del material genético hasta el reporte de resultados, tarda aproximadamente dos días de trabajo.

El diagnóstico se realiza en adultos (hembras y machos) de *Diatraea* spp., utilizados como pie de cría. Los mismos son procedentes de cámaras de reproducción del Laboratorio de Control Biológico, una vez verificada la postura, luego de su cópula individualizada, los progenitores se trasladan conservados en alcohol 70% a 4°C al Laboratorio de Biología Molecular para el diagnóstico de *Nosema* spp. Primeramente, se separa el abdomen de cada individuo mediante instrumentos de disección desinfectados con etanol 70% y se coloca en un tubo de microcentrífuga para la extracción de ADN.

También se analizan larvas obtenidas de progenitores previamente diagnosticados libres del microsporidio o procedentes de campo. De igual forma, se analizan individuos del biocontrolador *C. flavipes*, en los estadios de pupa y adulto. Tanto para las larvas como los especímenes de *C. flavipes*, se utiliza el organismo completo.

Para la extracción de ADN, se coloca el material biológico en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Posteriormente cada muestra es homogenizada mediante un disruptor mecánico. El homogenizado obtenido se utiliza directamente para la extracción de ADN total. Las muestras se incuban en una solución de extracción CTAB [2% p/v CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8,0; y 0,2% v/v b-mercaptoetanol] y Proteinasa K (0,4 mg/mL). Para cada muestra de ADN obtenida se lleva a cabo la cuantificación y evaluación de la pureza mediante espectrofotometría. Para visualizar la integridad del ADN se realiza electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

Las amplificaciones por PCR se llevan a cabo para amplificar la secuencia parcial de la región codificante para la subunidad pequeña del ARNr (SSU) del gen ARNr mediante los cebadores específicos diseñados con base en las regiones altamente conservadas de ambas subunidades (Zhu et al., 2010). Como control positivo de amplificación, se emplean los iniciadores A-298/B-tLYS que flanquean un fragmento del gen constitutivo citocromo oxidasa II (COII) de *Diatraea* spp.

Resultados y discusión

En la Figura 11 (carriles superiores), se observan algunas muestras representativas del total analizadas para la detección de *Nosema* spp., se considera un resultado positivo cuando se visualiza la presencia de una banda de tamaño molecular esperado (1245 pb) para los cebadores utilizados (18f/1537r), tomando como referencia el marcador de peso molecular. Además se llevó a cabo la secuenciación de tres muestras seleccionadas al azar, el análisis de las mismas mediante programas bioinformáticos y la herramienta BLASTn reveló que las secuencias de este estudio mostraron una similitud del 99% con secuencias

parciales de la subunidad pequeña del 16S ARN ribosomal, correspondiente al microsporidio *Nosema* spp. Por lo tanto, las muestras que fueron identificadas por secuenciación, se utilizan como control positivo de detección.

Asimismo, los cebadores empleados como control positivo de amplificación (A-298/B-tLYS) que flanquean un fragmento del gen constitutivo citocromo oxidasa II (COII) de *Diatraea* spp., comprobaron la completa viabilidad del ADN genómico obtenido, ya que se visualizó el amplicón del tamaño molecular esperado en todas las muestras (Figura 11, carriles inferiores). Este resultado demuestra la ausencia de inhibidores en las muestras, así como la integridad de la hebra molde de ADN.

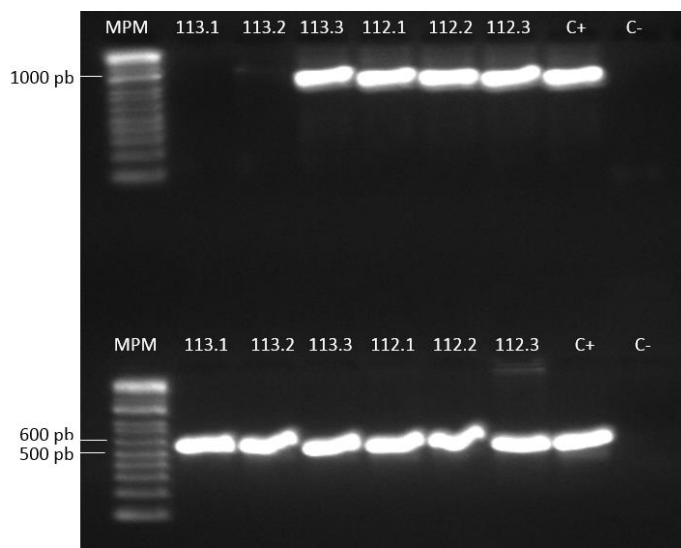


Figura 11. Productos de amplificación por PCR punto final. Carriles superiores: para la detección de *Nosema* spp. en ADN extraído *Diatraea* spp.. Carriles inferiores: control positivo de amplificación de la región COII de *Diatraea* spp. Visualizados con electroforesis en gel de agarosa 2%. Escalera de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Los análisis de rutina para la detección del microsporidio se llevan a cabo aplicando la metodología estandarizada y los iniciadores seleccionados (18f/1537r), la misma fue estandarizada desde el mes de septiembre del 2019 hasta la actualidad. Se examinaron hembras y machos adultos por separado para determinar la prevalencia de *Nosema* spp. tanto en individuos procedentes de laboratorio, como de campo. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 9, se detectaron 370 adultos infectados con el microsporidio (equivalente al 32,29%) del total de 1.146 analizados.

Cuadro 9. Porcentaje de incidencia del microsporidio *Nosema* spp. en **adultos** de *Diatraea* spp., diagnosticados por PCR punto final.

Procedencia	Sexo	Positivos	Negativos	Total	Porcentaje de incidencia (%)
Laboratorio	Hembras	170	378	548	31,02
	Machos	187	361	548	34,12
Campo	Hembras	7	17	24	29,17
	Machos	6	20	26	23,07
Total		370	776	1.146	32,29

En cuanto a los análisis realizados en larvas de laboratorio, resultaron 39 positivas de las 159 larvas analizadas (19,70%) y la totalidad de larvas procedentes de campo analizadas resultaron negativas para el diagnóstico del microsporidio. Mientras que las larvas certificadas, es decir, procedentes de progenitores sanos (según detección molecular previa), se obtuvieron 4 individuos positivos para la presencia de *Nosema* spp., del total de 77 larvas muestreadas (incidencia del 5%) (Cuadro 10).

Cuadro 10. Porcentaje de incidencia del microsporidio *Nosema* spp. en larvas de *Diatraea* spp., diagnosticados por PCR punto final.

Estadio y procedencia	Positivos	Negativos	Total	Porcentaje de incidencia (%)
Larvas lab.	39	159	198	19,70
Larvas campo	0	11	11	0
Larvas certificadas	4	73	77	5
Total	48	244	292	16,44

Se ha reportado que la PCR posee la sensibilidad de detectar hasta 10 esporas por reacción, aunque la intensidad de la banda decrece conforme disminuye la cantidad de esporas, se mantiene visible a estas bajas concentraciones (Hamiduzzaman et al., 2010). No obstante, el límite de detección de una reacción PCR varía en función de la fuente del material genético, el equipo, reactivos, los cebadores y la calidad del ADN molde; por estas razones es recomendable adaptar el ensayo de sensibilidad a las condiciones experimentales utilizadas (Bustin & Huggett, 2017). Este ensayo es imprescindible para determinar el límite de detección del método, lo cual se reflejó en los resultados que indicaron la presencia de *Nosema* spp. en larvas procedentes de progenitores diagnosticados como sanos (según análisis moleculares previos), por lo tanto, es posible que alguno o ambos progenitores se encontraban infectados con una baja concentración de esporas a niveles no detectables por el método empleado.

Cuadro 11. Porcentaje de incidencia del microsporidio *Nosema* spp. en **pupas y adultos de *C. flavipes***, diagnosticados por PCR punto final.

Estadio y procedencia	Positivos	Negativos	Total	Porcentaje de incidencia (%)
Pupas lab.	183	33	216	84,72
Pupas campo	7	6	13	53,85
Avispas lab.	31	7	38	81,58
Avispas campo	7	3	10	70
Total	228	49	277	82,31

Según los resultados mostrados en el Cuadro 11, la incidencia de microsporidios en *C. flavipes* es considerablemente elevada, independientemente del estadio y procedencia, con un porcentaje de incidencia total del 82,31%. Para reducir la carga tan elevada de microsporidios es urgente implementar la aplicación de tratamientos efectivos, diversos autores han comprobado que los compuestos conocidos como timol, resveratrol y naringenina son altamente efectivos para reducir la carga de *Nosema* spp. en abejas melíferas (*Apis mellifera*) (Borges et al., 2020; Costa et al., 2010). Por lo tanto, próximamente se pretende realizar pruebas para comprobar la efectividad y las dosis necesarias para el control del microsporidio en *C. flavipes*, bajo las condiciones de nuestro laboratorio, específicamente.

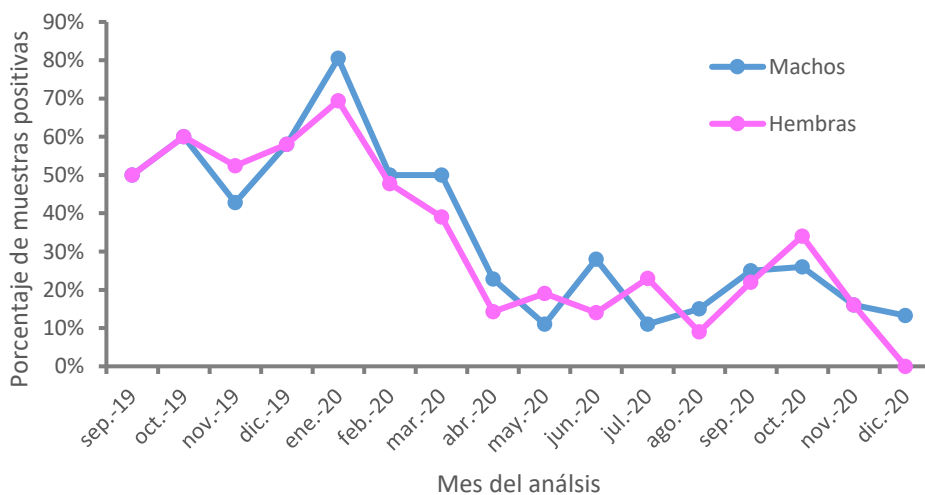


Figura 12. Tendencia de muestras positivas para la presencia de *Nosema* spp. en adultos de pie de cría de *Diatraea* spp. (machos y hembras) desde el mes de septiembre, 2019 hasta diciembre, 2020.

En la Figura 12, se muestra la tendencia de resultados positivos para la presencia de *Nosema* spp. en adultos de *Diatraea* spp. (machos y hembras) utilizados como pie de cría desde que se implementó el diagnóstico del microsporidio mediante la técnica de PCR punto final (septiembre, 2019- actualidad). En el mismo es posible observar una tendencia de reducción en la incidencia de microsporidios para las muestras analizadas. Esta disminución paulatina en la incidencia es producto de la implementación de un análisis más sensible, eficaz y confiable, en comparación con el método de detección antecesor (mediante visualización por microscopía óptica).

Utilizando un protocolo de detección más confiable como la PCR, se evita la propagación del microsporidio al descartar las posturas provenientes de progenitores infectados, garantizando la sanidad de las larvas utilizadas como hospederas, con el objetivo de incrementar la calidad y cantidad de los parasitoides producidos. Como control paralelo, se deben esterilizar el agua y los sustratos utilizados, así como superficies, para mitigar tanto la vía de transmisión vertical como la horizontal.

Como lo demostraron los resultados obtenidos, fue exitosa la aplicación de esta técnica para monitorear la presencia de microsporidios en adultos de pie de cría de *Diatraea* spp., como análisis de rutina para el control de calidad de la progenie, que será utilizada en su etapa de larva para la reproducción masiva de *C. flavipes*.

Conclusiones

La técnica de PCR ofrece una serie de ventajas sobre la observación por microscopía de luz, la primera se caracteriza por un alto nivel de sensibilidad de detección, además elimina el riesgo de una identificación errónea por confusión con otros parásitos u otras estructuras como gránulos de almidón. Asimismo, la PCR permite detectar una baja concentración de esporas que pueden pasar desapercibidas por microscopía, y es capaz de detectar el microsporidio en cualquier estadio del ciclo de vida.

Los resultados muestran que es factible la aplicación de esta técnica para monitorear la presencia de microsporidios en adultos de pie de cría de *Diatraea* spp., como análisis de rutina para el control de calidad de la progenie, que será utilizada en su etapa de larva para la reproducción masiva de *C. flavipes*.

Referencias bibliográficas

- Abou-Jawdah, Y., Eid, S. G., Atamian, H. S., & Havey, M. (2008). Assessing the Movement of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* in Susceptible and Tolerant Cucumber Germplasms Using Serological and Nucleic Acid-based Methods. *Journal of Phytopathology*, 156(7–8), 438–445. doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01388.x
- Ahmad, A., Wang, J. D., Pan, Y. B., Sharif, R., & Gao, S. J. (2018). Development and use of simple sequence repeats (SSRs) markers for sugarcane breeding and genetic studies. *Agronomy*, 8(11), 260.
- Aljanabi, S. M., Parmessur, Y., Moutia, Y., Saumtally, S., & Dookun, A. (2001). Further evidence of the association of a phytoplasma and a virus with yellow leaf syndrome in sugarcane. *Plant Pathology*, 50(5), 628–636. doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00604.x
- Azofeifa-Delgado, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía mesoamericana*, 221-242.
- Badilla-Fernández, F. (2002). Un programa exitoso de control biológico de insectos plaga de la caña de azúcar en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 64, 77–87.
- Barrera, G. P., Villamizar, L. F., Espinel, C., Quintero, E. M., Belaich, M. N., Toloza, D. L., ... & Vargas, G. (2017). Identification of *Diatraea* spp. (Lepidoptera: Crambidae) based on cytochrome oxidase II. *PloS one*, 12(9), e0184053.
- Balmaseda, A., Zambrana, J. V., Collado, D., García, N., Saborío, S., Elizondo, D., Mercado, J. C., Gonzalez, K., Cerpas, C., Nuñez, A., Corti, D., Waggoner, J. J., Kuan, G., Burger-Calderon, R., & Harris, E. (2018). Comparison of four serological methods and two reverse transcription-PCR assays for diagnosis and surveillance of Zika virus infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(3). doi.org/10.1128/JCM.01785-17
- Borges, D., Guzman-Novoa, E., & Goodwin, P. H. (2020). Control of the microsporidian parasite *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*) using nutraceutical and immuno-stimulatory compounds. *Plos one*, 15(1), e0227484.
- Boukari, W., Kaye, C., Wei, C., Hincapie, M., LaBorde, C., Ireby, M., & Rott, P. (2019). Field Infection of Virus-Free Sugarcane by *Sugarcane Yellow Leaf Virus* and Effect of Yellow Leaf on Sugarcane Grown on Organic and on Mineral Soils in Florida. *Plant Disease*, 103(9), 2367–2373. doi.org/10.1094/PDIS-01-19-0199-RE

- Bustin, S., y Huggett, J. 2017. qPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification*, 14, 19–28.
- Cardozo Burgos, C. Estimación de niveles de resistencia al virus de la hoja amarilla (SCYLV) mediante la técnica de PCR en tiempo real (RT-qPCR) en variedades de caña de azúcar (Tesis de Doctorado en Ciencias Agrarias). Universidad Nacional de Colombia. Recuperado de <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/59467>
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., & Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 69(2), 330–339. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2007.02.000>
- Chatenet, M., Delage, C., Ripolles, M., Irely, M., Lockhart, B. E. L., & Rott, P. (2001). Detection of *Sugarcane yellow leaf virus* in quarantine and production of virus-free sugarcane by apical meristem culture. *Plant Disease*, 85(11), 1177–1180. doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.11.1177
- Chavarría, E; Moreira, L., Lockhart, B. E.; Rivera, C.; Villalobos, W. (2006). Estudio de la distribución de las enfermedades virosas de la caña de azúcar en Costa Rica. In: Congreso de la Asociación de Técnicos Azucareros de Costa Rica (XVI, Guanacaste, CR) Memorias 2006. San José, CR. Ed. M. A. Chaves Solera. p 619 – 633.
- Chen, D., Shen, Z., Zhu, F., Guan, R., Hou, J., Zhang, J., ... Xu, L. (2012). Phylogenetic characterization of a microsporidium (*Nosema* sp. MPr) isolated from the *Pieris rapae*. *Parasitology Research*, 111(1), 263–269.
- Chinnaraja, C., Viswanathan, R., Sathyabhama, M., Parameswari, B., Bagyalakshmi, K., Malathi, P., & Neelamathi, D. (2014). Quantification of *Sugarcane yellow leaf virus* in in vitro plantlets and asymptomatic plants of sugarcane by RT-qPCR. *Current Science*, 106(5), 729–734. doi.org/10.2307/24099972
- Christaki, E., Marcou, M., & Tofarides, A. (2020). Antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, evolution, and persistence. *Journal of molecular evolution*, 88(1), 26-40.
- Cordeiro, G.M., Taylor, G.O. & Henry, R.J. (2000). Characterisation of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* sp.), a highly polyploid species. *Plant Sci.* 155, 161-168.
- Costa, C., Lodesani, M., & Maistrello, L. (2010). Effect of thymol and resveratrol administered with candy or syrup on the development of *Nosema ceranae* and on

- the longevity of honeybees (*Apis mellifera* L.) in laboratory conditions. *Apidologie*, 41(2), 141-150.
- ElSayed, A. I., Weig, A. R., & Komor, E. (2011). Molecular characterization of Hawaiian *Sugarcane yellow leaf virus* genotypes and their phylogenetic relationship to strains from other sugarcane-growing countries. *European Journal of Plant Pathology*, 129(3), 399–412. doi.org/10.1007/s10658-010-9703-0
- Fang, J. Y., & Hsu, Y. R. (2012). Molecular identification and antibiotic control of endophytic bacterial contaminants from micropropagated *Aglaonema* cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 110(1), 53-62.
- Freitas, F., Morales-Corrêa e Castro, A., Barbosa, N., y Fernandes, O. (2018). Characterization and Comparison of Genetic Variation in *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) Mass Reared for Biological Pest Control Using Microsatellite Markers. *Neotropical Entomology*, 47, 433–439.
- Hamiduzzaman, M. M., Guzman-Novoa, E., y Goodwin, P. H. 2010. A multiplex PCR assay to diagnose and quantify *Nosema* infections in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 105(2), 151–155.
- Harris-Shultz, K., Ni, X., Wadl, P. A., Wang, X., Wang, H., Huang, F., ... & Xue, Q. (2017). Microsatellite markers reveal a predominant sugarcane aphid (Homoptera: Aphididae) clone is found on sorghum in seven states and one territory of the USA. *Crop Science*, 57(4), 2064-2072.
- Hernández-Velázquez, V. M., Lina-García, L. P., Obregón-Barboza, V., Trejo-Loyo, A. G., y Peña-Chora, G. (2012). Pathogens Associated with Sugarcane Borers, *Diatraea* spp. (Lepidoptera: Crambidae): A Review. *International Journal of Zoology*, 2012, 1–12.
- Keeling, P. J., y Fast, N. M. (2002). Microsporidia: Biology and Evolution of Highly Reduced Intracellular Parasites. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 93–116.
- Kyei-poku, G., Gauthier, D., y Van Frankenhuyzen, K. (2008). Molecular Data and Phylogeny of *Nosema* Infecting Lepidopteran Forest Defoliators in the Genera *Choristoneura* and *Malacosoma*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 55(1), 51–58.
- Madugula, S., & Gali, U. D. (2017). Virus indexing for *Sugarcane Yellow Leaf Virus* (SCYLV) in field varieties and in vitro regenerated plantlets of sugarcane. *Australasian Plant Pathology*, 46(5), 433–439. doi.org/10.1007/s13313-017-0505-0

- Moreno-Vázquez, S., Larrañaga, N., Uberhuaga, E. C., Braga, E. J. B., & Pérez-Ruíz, C. (2014). Bacterial contamination of in vitro plant cultures: confounding effects on somaclonal variation and detection of contamination in plant tissues. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 119(3), 533-541.
- Oliveira, K. M., Pinto, L. R., Marconi, T. G., Mollinari, M., Ulian, E. C., Chabregas, S. M., ... & Souza, A. P. (2009). Characterization of new polymorphic functional markers for sugarcane. *Genome*, 52(2), 191-209.
- Scagliusi, S., Saikat, K., de Gouvea, J., & Vega, J. (2008). Comparison of Two Diagnostic Methods for Evaluation of *Sugarcane yellow leaf virus* Concentration in Brazilian Sugarcane Cultivars. *Functional Plant Science and Biotechnology*, 3(1), 26–30. doi.org/10.1586/14737159.9.2.187
- Sebastião, F. de A., Lemos, E. G. M., & Pilarski, F. (2015). Validation of absolute quantitative real-time PCR for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae* in fish. *Journal of Microbiological Methods*, 119, 168–175. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2015.10.021>
- Simões, R. A., Feliciano, J. R., Solter, L. F., y Delalibera, I. (2015). Impacts of *Nosema* sp. (Microsporidia: Nosematidae) on the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 129, 7–12.
- Simões, R. A., Reis, L. G., Bento, J. M. S., Solter, L. F., & Delalibera, I. (2012). Biological and behavioral parameters of the parasitoid *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) are altered by the pathogen *Nosema* sp. (Microsporidia: Nosematidae). *Biological Control*, 63(2), 164–171
- Singh, B. N., Dwivedi, P., Sarma, B. K., Singh, G. S., & Singh, H. B. (2019). A novel function of N-signaling in plants with special reference to Trichoderma interaction influencing plant growth, nitrogen use efficiency, and cross talk with plant hormones. *Biotech*, 9(3), 109.
- Singh, D., Rao, G. P., Snehi, S. K., Raj, S. K., Karuppaiah, R., & Viswanathan, R. (2011). Molecular detection and identification of thirteen isolates of *Sugarcane yellow leaf virus* associated with sugarcane yellow leaf disease in nine sugarcane growing states of India. *Australasian Plant Pathology*, 40(5), 522–528. doi.org/10.1007/s13313-011-0061-y

- Singh, R. B., Singh, B., & Singh, R. K. (2015). Development of microsatellite (SSRs) markers and evaluation of genetic variability within sugarcane commercial varieties (*Saccharum* spp. hybrids). *Int J Adv Res*, 3(12), 700-708.
- Singh, R. K., Srivastava, S., Singh, S. P., Sharma, M. L., Mohopatra, T., Singh, N. K., & Singh, S. B. (2008). Identification of new microsatellite DNA markers for sugar and related traits in sugarcane. *Sugar Tech*, 10(4), 327-333.
- Soltan, M. A., Tsai, Y. L., Lee, P. Y. A., Tsai, C. F., Chang, H. F. G., Wang, H. T. T., & Wilkes, R. P. (2016). Comparison of electron microscopy, ELISA, real time RT-PCR and insulated isothermal RT-PCR for the detection of Rotavirus group A (RVA) in feces of different animal species. *Journal of Virological Methods*, 235, 99–104. doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.05.00
- Stefani, F., Bencherif, K., Sabourin, S., Hadj-Sahraoui, A. L., Banchini, C., Séguin, S., & Dalpé, Y. (2020). Taxonomic assignment of arbuscular mycorrhizal fungi in an 18S metagenomic dataset: a case study with saltcedar (*Tamarix aphylla*). *Mycorrhiza*, 1-13.
- Suanyuk, N., Kong, F., Ko, D., Gilbert, G. L., & Supamattaya, K. (2008). Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia *Oreochromis* sp. and Nile tilapia *O. niloticus* in Thailand—Relationship to human isolates? *Aquaculture*, 284(1–4), 35–40. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.07.034
- Terato, K., Do, C. T., Cutler, D., Waritani, T., & Shionoya, H. (2014). Preventing intense false positive and negative reactions attributed to the principle of ELISA to re-investigate antibody studies in autoimmune diseases. *Journal of Immunological Methods*, 407, 15–25. doi.org/10.1016/j.jim.2014.03.013
- Tew, T. L., & Pan, Y. B. (2010). Microsatellite (simple sequence repeat) marker-based paternity analysis of a seven-parent sugarcane polycross. *Crop Science*, 50(4), 1401-1408.
- Tokarska, M., Marshall, T., Kowalczyk, R., Wójcik, J. M., Pertoldi, C., Kristensen, T. N., ... & Bendixen, C. (2009). Effectiveness of microsatellite and SNP markers for parentage and identity analysis in species with low genetic diversity: the case of European bison. *Heredity*, 103(4), 326.
- Viswanathan, R. (2015). Varietal Degeneration in Sugarcane and its Management in India. *Sugar Tech*, 18(1), 1–7. doi.org/10.1007/s12355-015-0369-y
- Xie, Y., Wang, M., Xu, D., Li, R., & Zhou, G. (2009). Simultaneous detection and identification

of four sugarcane viruses by one-step RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 162(1–2), 64–68. doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.07.015

Zhu, Y. J., Lim, S. T. S., Schenck, S., Arcinas, A., & Komor, E. (2010). RT-PCR and quantitative real-time RT-PCR detection of *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) in symptomatic and asymptomatic plants of Hawaiian sugarcane cultivars and the correlation of SCYLV titre to yield. *European Journal of Plant Pathology*, 127(2), 263–273. doi.org/10.1007/s10658-010-9591-3

Zhu, F., Shen, Z., Xu, X., Tao, H., Dong, S., Tang, X., y Xu, L. (2010). Phylogenetic Analysis of Complete rRNA Gene Sequence of *Nosema philosamiae* Isolated from the Lepidopteran *Philosamia cynthia ricini*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 57(3), 294–296